

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**  
Departamento de Medicina y Cirugía Animal



**TESIS DOCTORAL**

**Estudio epidemiológico de la infección por "Anaplasma phagocytophilum, A. marginale, A. Centrale, Babesia bigemina, B. divergens y Theileria annulata" en ganado vacuno en extensivo de la Comunidad de Madrid**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Lydia Calleja Bueno**

**Directores**

**Alejandra Villaescusa Fernández**  
**Juan Vicente González Martín**  
**Mercedes García-Sancho Téllez**

**Madrid**  
**Ed. electrónica 2019**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL**



**TESIS DOCTORAL**

**ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE LA INFECCIÓN POR**  
***Anaplasma phagocytophilum*, *A. marginale*, *A. centrale*,**  
***Babesia bigemina*, *B. divergens* y *Theileria annulata***  
**EN GANADO VACUNO EN EXTENSIVO DE LA COMUNIDAD DE**  
**MADRID**

**LYDIA CALLEJA BUENO**

Madrid, 2018



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**  
**DEPARTAMENTO DE MEDICINA Y CIRUGÍA ANIMAL**



**TESIS DOCTORAL**

**ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO DE LA INFECCIÓN POR**  
***Anaplasma phagocytophilum*, *A. marginale*, *A. centrale*,**  
***Babesia bigemina*, *B. divergens* y *Theileria annulata***  
**EN GANADO VACUNO EN EXTENSIVO DE LA COMUNIDAD DE**  
**MADRID**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA  
PRESENTADA POR

**Lydia Calleja Bueno**

DIRECTORES

**Alejandra Villaescusa Fernández**

**Juan Vicente González Martín**

**Mercedes García-Sancho Téllez**

Madrid, 2018



D<sup>a</sup> Alejandra Villaescusa Fernández, con D.N.I. 7006019-Y, Profesora Contratada Doctora Interina del Departamento de Medicina y Cirugía Animal, en la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid,

D. Juan Vicente González Martín, con D.N.I. 51358828-N, Profesor Titular de Escuela Universitaria del Departamento de Medicina y Cirugía Animal, en la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, y

D<sup>a</sup> Mercedes García-Sancho Téllez, con D.N.I. 51079658-Q, Profesora Contratada Doctora del Departamento de Medicina y Cirugía Animal, en la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid,

**CERTIFICAN:**

Que la Tesis Doctoral titulada “Estudio epidemiológico de la infección por *Anaplasma phagocytophilum*, *A. marginale*, *A. centrale*, *Babesia bigemina*, *B. divergens* y *Theileria annulata* en ganado vacuno en extensivo de la Comunidad de Madrid.”, ha sido realizada bajo su dirección y supervisión por D<sup>a</sup>. Lydia Calleja Bueno.

Revisado el presente trabajo, consideran que tiene la debida calidad para su presentación y defensa.

En Madrid, a 10 de septiembre de 2018,

Alejandra Villaescusa

Juan Vicente González

Mercedes García-Sancho



*A mis padres.*





## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, quiero agradecer a mis directores de tesis, Alejandra Villaescusa, Juan Vicente González y Mercedes García-Sancho, su ayuda, tiempo y apoyo durante todo este proceso. Gracias por darme la oportunidad de iniciar esta aventura en el mundo de la investigación.

Sin duda, esta tesis doctoral, no hubiera sido posible sin la ayuda de los compañeros veterinarios que se encuentran trabajando en el campo. Muchas gracias a José Luis Arroyo, Adolfo Marchesi, Javier Blanco, Carlos Coronel, Javier Cancho, Juan Antonio García, Sergio Santos, Fernando Criado, Eutiquio Esteban, Jesús Redondo, Miguel Ángel González y Raquel Patrón.

Gracias a Ángel y Fernando, por vuestros ánimos y consejos. A Tino, por hacer de la vida en el laboratorio un mundo mejor, por tu cariño y hacernos sonreír. A David y Bea por estar dispuestos a echar un cable siempre.

A LAV, en especial a Gustavo Sánchez y a todo su equipo.

A Ricardo García por la estadística. Gracias por tu paciencia y disposición en todo momento.

A mis padres.

Gracias a todos aquellos que habéis colaborado de un modo u otro en esta tesis doctoral.



## ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ALT</b>	Alanina aminotransferasa
<b>AST</b>	Aspartato aminotransferasa
<b>BUN</b>	<i>Blood urea nitrogen</i>
<b>C</b>	Zona de clima mediterráneo continentalizado con veranos cálidos
<b>CAM</b>	Comunidad Autónoma de Madrid
<b>CDC</b>	Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de Estados Unidos
<b>cELISA</b>	ELISA de competición
<b>CHAID</b>	Chi-square automatic interaction detection
<b>CHCM</b>	Concentración de hemoglobina corpuscular media
<b>CMH</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad
<b>DE</b>	Desviación estándar
<b>ECF</b>	<i>East Coast Fever</i>
<b>EDTA</b>	Ácido etilendiaminetetraacético
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
<b>F</b>	Zona de clima mediterráneo continentalizado con veranos frescos
<b>GAPDH</b>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
<b>GGT</b>	Gamma glutamil transpeptidasa
<b>GLDH</b>	Glutamato deshidrogenasa
<b>GR</b>	Glóbulos rojos
<b>Hb</b>	Hemoglobina
<b>HCM</b>	Hemoglobina corpuscular media
<b>HCVC</b>	Hospital Clínico Veterinario Complutense
<b>HGA</b>	<i>Human granulocytic anaplasmosis</i>
<b>HGE</b>	<i>Human granulocytic ehrlichiosis</i>
<b>HR</b>	Humedad relativa
<b>Htc</b>	Hematocrito
<b>IC</b>	Intervalo de confianza
<b>IFI</b>	Inmunofluorescencia indirecta
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferón gamma
<b>Ig</b>	Inmunoglobulinas
<b>INE</b>	Instituto Nacional de Estadística
<b>LM</b>	Lactonas macrocíclicas
<b>M</b>	Zona de clima de montaña
<b>MAPAMA</b>	Ministerios de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente
<b>MASP</b>	Sistema de fase estacionaria microaerófila
<b>NK</b>	<i>Natural killer</i>
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>OIE</b>	Organización Mundial de Sanidad Animal
<b>OP</b>	Organofosforados
<b>OR</b>	Odds ratio
<b>P</b>	Piretroides
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>RFLP</b>	Análisis de polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción
<b>RLB</b>	<i>Reverse line blot hybridization assay</i>
<b>ROS</b>	Especies reactivas del oxígeno
<b>SITRAN</b>	Sistema Integral de Trazabilidad Animal
<b>TBF</b>	<i>Tick-borne fever</i>
<b>Tc</b>	Linfocitos T citotóxicos

<b>h</b>	Linfocitos T cooperadores
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>VCM</b>	Volumen corpuscular medio
<b>VESA</b>	<i>Variant erythrocyte surface antigen</i>
<b>WTD</b>	<i>White-tailed deer agent</i>

## ÍNDICE



<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>5</b>
<b>2.1 SISTEMAS EXTENSIVOS DE EXPLOTACIÓN DEL GANADO BOVINO .....</b>	<b>7</b>
2.1.1.La ganadería extensiva.....	7
2.1.2. Distribución de la ganadería extensiva en la Comunidad de Madrid .....	9
<b>2.2. ENFERMEDADES VECTORIALES DEL BOVINO .....</b>	<b>12</b>
2.2.1. Anaplasmosis.....	15
2.2.1.1. <i>Anaplasma phagocytophilum</i> .....	17
2.2.1.2. <i>Anaplasma marginale</i> .....	36
2.2.1.3. <i>Anaplasma centrale</i> .....	55
2.2.2. Babesiosis .....	63
2.2.2.1. <i>Babesia bigemina</i> .....	67
2.2.2.2. <i>Babesia divergens</i> .....	81
2.2.3. Theileriosis.....	96
2.2.3.1. <i>Theileria annulata</i> .....	99
<b>3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.....</b>	<b>115</b>
3.1. JUSTIFICACIÓN .....	117
3.2. OBJETIVOS .....	119
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>121</b>
<b>4.1. ANIMALES .....</b>	<b>123</b>
4.1.1. Delimitación geográfica de las zonas de estudio .....	123
4.1.2. Selección de la muestra.....	127
4.1.3. Criterio de selección de animales .....	129
<b>4.2. RECOGIDA DE DATOS.....</b>	<b>130</b>
<b>4.3. TOMA DE MUESTRAS.....</b>	<b>134</b>
<b>4.4. ANÁLISIS LABORATORIALES .....</b>	<b>134</b>
4.4.1. Analítica sanguínea.....	135
4.4.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) .....	136
4.4.2.1. Extracción de ADN.....	136
4.4.2.2. Cuantificación y calidad del ADN .....	137
4.4.2.3. Control de la extracción de ADN.....	137
4.4.2.4. Procesado de las muestras mediante PCR .....	138
4.4.2.5. Purificación de ADN y secuenciación .....	146
<b>4.5. ESTUDIO ESTADÍSTICO .....</b>	<b>146</b>
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>149</b>



<b>5.1. DESCRIPCIÓN DE LOS ANIMALES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO .....</b>	<b>151</b>
5.1.1. Delimitación de las zonas de estudio .....	151
5.1.2. Resultados de la selección de la muestra a incluir en el estudio .....	155
5.1.3. Caracterización de los animales y sus granjas de procedencia .....	156
5.1.3.1. Descripción de los datos de la reseña de los animales del estudio ...	156
5.1.3.2. Distribución geográfica .....	162
5.1.3.3. Momento de la recogida de las muestras .....	164
5.1.3.4. Características del sistema productivo de las granjas estudiadas ....	166
5.1.3.5. Presencia de garrapatas en el momento de la toma de muestras y tratamientos antiparasitarios.....	167
5.1.3.6. Historial de enfermedades transmitidas por garrapatas .....	171
5.1.3.7. Contacto con animales de otras especies .....	173
<b>5.2. RESULTADOS DE LA HEMATOLOGÍA Y BIOQUÍMICA SANGUÍNEA DE LOS ANIMALES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO .....</b>	<b>174</b>
<b>5.3. RELACIONES ENTRE LA AMPLIFICACIÓN DE ADN DE LOS AGENTES ESTUDIADOS Y LAS VARIABLES EPIDEMIOLÓGICAS RECOGIDAS .</b>	<b>177</b>
5.3.1. Resultados de la PCR de <i>Anaplasma phagocytophilum</i> en los animales de estudio .....	177
5.3.1.1. Prevalencia en la Comunidad de Madrid.....	177
5.3.1.2. Relación entre la positividad a <i>A. phagocytophilum</i> y los datos epidemiológicos recogidos .....	177
5.3.1.3. Relación entre la positividad a <i>A. phagocytophilum</i> y los resultados de la hematología y de la bioquímica sanguínea de los animales incluidos en el estudio .....	184
5.3.2.4. Árbol de decisión de <i>A. phagocytophilum</i> .....	186
5.3.2. Resultados de la PCR de <i>Anaplasma marginale</i> en los animales de estudio .....	186
5.3.2.1. Prevalencia en la Comunidad de Madrid.....	186
5.3.2.2. Relación entre la positividad frente a <i>A. marginale</i> y los datos epidemiológicos recogidos.....	187
5.3.2.3. Relación entre la positividad a <i>A. marginale</i> y los resultados de la hematología y de la bioquímica sanguínea de los animales incluidos en el estudio .....	198
5.3.2.4. Árbol de decisión de <i>A. marginale</i> .....	199
5.3.3. Resultados de la PCR de <i>Anaplasma centrale</i> en los animales del estudio .....	200

5.3.4. Resultados de la PCR de <i>Babesia bigemina</i> en los animales de estudio.....	200
5.3.4.1. Prevalencia en la Comunidad de Madrid .....	200
5.3.4.2. Relación entre la positividad a <i>B. bigemina</i> y los datos epidemiológicos recogidos .....	201
5.3.4.3. Relación entre la positividad a <i>B. bigemina</i> y los resultados de la hematología y de la bioquímica sanguínea de los animales incluidos en el estudio .....	212
5.3.4.4. Árbol de decisión de <i>B. bigemina</i> .....	213
5.3.5. Resultados de la PCR de <i>Babesia divergens</i> en los animales de estudio.....	214
5.3.5.1. Prevalencia en la Comunidad de Madrid .....	214
5.3.5.2. Relación entre la positividad a <i>B. divergens</i> y los datos epidemiológicos recogidos .....	215
5.3.5.3. Relación entre la positividad a <i>B. divergens</i> y los resultados de la hematología y de la bioquímica sanguínea de los animales incluidos en el estudio .....	223
5.3.5.4. Árbol de decisión de <i>B. divergens</i> .....	224
5.3.6. Resultados de la PCR de <i>Theileria annulata</i> en los animales de estudio.....	225
5.3.6.1. Prevalencia en la Comunidad de Madrid .....	225
5.3.6.2. Relación entre la positividad a <i>T. annulata</i> y los datos epidemiológicos recogidos .....	225
5.3.6.3. Relación entre la positividad a <i>T. annulata</i> y los resultados de la hematología y de la bioquímica sanguínea de los animales incluidos en el estudio .....	237
5.3.6.4. Árbol de decisión de <i>T. annulata</i> .....	238
5.3.7. Presencia de coinfecciones en los animales del estudio.....	239
5.3.7.1. Prevalencia de coinfecciones en la Comunidad de Madrid.....	239
5.3.7.2. Asociaciones estadísticas entre los agentes estudiados .....	241
5.3.7.3. Relación entre la presencia de coinfecciones y los datos epidemiológicos recogidos.....	242
5.3.7.4. Relación entre la presencia de coinfecciones y los resultados de la hematología y de la bioquímica sanguínea de los animales incluidos en el estudio .....	255
<b>6. DISCUSIÓN .....</b>	<b>257</b>
6.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS ANIMALES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO .....	259
6.2. <i>Anaplasma phagocytophilum</i> .....	263

6.3. <i>Anaplasma marginale</i> .....	268
6.4. <i>Anaplasma centrale</i> .....	276
6.5. <i>Babesia bigemina</i> .....	277
6.6. <i>Babesia divergens</i> .....	284
6.7. <i>Theileria annulata</i> .....	288
6.8. COINFECCIONES .....	295
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>301</b>
<b>8. RESUMEN.....</b>	<b>307</b>
<b>9. SUMMARY .....</b>	<b>313</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>319</b>

## ÍNDICE DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Descripción de la población en función de la raza.....	157
Gráfico 2. Porcentaje de animales distribuidos según el grupo de edad.....	160
Gráfico 3. Porcentaje de bovinos de los diferentes grupos de edad en función de las zonas de estudio.....	162
Gráfico 4. Estación del año de recogida de las muestras .....	165
Gráfico 5. Porcentaje de granjas en las que se desparasitaba una vez al año, dos veces al año, más de dos veces al año, así como en las granjas donde no se desparasitaba.....	168
Gráfico 6. Distribución de las granjas según la zona donde se encuentran y el número de veces que desparasita por año.....	169
Gráfico 7. Distribución de las granjas según la zona donde se encuentran y el fármaco empleado para desparasitar.....	171
Gráfico 8. Porcentaje de animales positivos a <i>A. marginale</i> en los diferentes grupos de edad.....	188
Gráfico 9. Porcentaje de animales positivos a <i>A. marginale</i> en relación con la estación del año.....	193
Gráfico 10. Porcentaje de animales positivos a <i>A. marginale</i> en función del número de desparasitaciones al año.....	195
Gráfico 11. Porcentaje de animales positivos a <i>A. marginale</i> en relación con el fármaco utilizado.....	196
Gráfico 12. Porcentaje de animales positivos a <i>B. bigemina</i> en los diferentes grupos de edad.....	203
Gráfico 13. Porcentaje de animales positivos a <i>B. bigemina</i> en función del número de desparasitaciones al año.....	209
Gráfico 14. Porcentaje de animales positivos a <i>B. bigemina</i> en relación con el fármaco utilizado.....	210
Gráfico 15. Porcentaje de animales positivos a <i>B. divergens</i> en los diferentes grupos de edad.....	215
Gráfico 16. Porcentaje de animales positivos a <i>T. annulata</i> en los diferentes grupos de edad.....	227
Gráfico 17. Porcentaje de animales positivos a <i>T. annulata</i> en relación con el mes de la toma de muestras .....	231

## ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1. Montes de utilidad pública en la Comunidad de Madrid.....	11
Imagen 2. Mapa de relieve del “Atlas. El Medio Ambiente en la Comunidad de Madrid” .....	124
Imagen 3. Mapa de temperatura media anual del “Atlas. El Medio Ambiente en la Comunidad de Madrid” .....	125
Imagen 4. Mapa de precipitación media anual del “Atlas. El Medio Ambiente en la Comunidad de Madrid” .....	126
Imagen 5. Mapa político de la Comunidad de Madrid.....	127
Imagen 6. Encuesta dirigida a los ganaderos, “Cuestionario Ganadero” .....	131
Imagen 7. Encuesta dirigida a los veterinarios, “Cuestionario Veterinario” .....	132
Imagen 8. Encuesta propia, “Cuestionario de muestreo” .....	133
Imagen 9. Mapa empleado en el estudio, en el que se muestran los municipios incluidos en cada zona climática de la Comunidad de Madrid.....	152
Imagen 10. Mapa de la Comunidad de Madrid con los municipios y las zonas donde se encontraban las granjas y animales del estudio .....	164
Imagen 11. Localización de las dos granjas positivas a <i>A. phagocytophilum</i> .....	178
Imagen 12. Localización geográfica de las dos granjas de los Molinos .....	179
Imagen 13. Árbol de decisión de <i>A. phagocytophilum</i> .....	186
Imagen 14. Mapa con los municipios y su prevalencia de <i>A. marginale</i> .....	191
Imagen 15. Árbol de decisión de <i>A. marginale</i> .....	200
Imagen 16. Mapa con los municipios y su prevalencia de <i>B. bigemina</i> .....	205
Imagen 17. Árbol de decisión de <i>B. bigemina</i> .....	214
Imagen 18. Mapa con los animales positivos a <i>B. divergens</i> y sus municipios de procedencia.....	218
Imagen 19. Árbol de decisión de <i>B. bigemina</i> .....	225
Imagen 20. Mapa con los municipios y su prevalencia de <i>T. annulata</i> .....	229
Imagen 21. Árbol de decisión de <i>T. annulata</i> .....	239

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. El censo de ganado bovino de la Comunidad de Madrid es de 93.720, clasificado según la edad de los animales, el sexo y el destino, sacrificio o reposición.....	10
Tabla 2. Distribución de la población de ganado vacuno en extensivo de la Comunidad de Madrid según las zonas climáticas establecidas.....	129
Tabla 3. Valores de referencia del hemograma y del análisis bioquímico .....	136
Tabla 4. Condiciones de la reacción para la PCR de <i>housekeeping</i> .....	142
Tabla 5. Condiciones de la reacción para la PCR de <i>A. phagocytophilum</i> .....	143
Tabla 6. Condiciones de la reacción para la PCR de <i>A. marginale</i> .....	143
Tabla 7. Condiciones de la reacción para la PCR de <i>A. centrale</i> . .....	143
Tabla 8. Condiciones de la reacción para la PCR de <i>B. bigemina</i> .....	143
Tabla 9. Condiciones de la primera reacción para la PCR de <i>B. divergens</i> .....	144
Tabla 10. Condiciones de la reacción para la PCR de <i>T. annulata</i> .....	144
Tabla 11. Municipios con ganado bovino en extensivo incluidos en cada una las zonas climáticas de la Comunidad de Madrid. Los municipios a los que pertenecían las granjas muestreadas se resaltan en negrita.....	154
Tabla 12. Resultados de la selección de la población de estudio en función de la zona.....	155
Tabla 13. Distribución de los animales en función de la granja.....	156
Tabla 14. Distribución de la población en función de la raza .....	157
Tabla 15. Distribución de la raza principal en función de la granja.....	158
Tabla 16. Distribución de la población según la raza y la zona.....	159
Tabla 17. Distribución de la población según el sexo de los animales.....	159
Tabla 18. Distribución de la población según la zona y el sexo .....	160
Tabla 19. Distribución de la población según la edad.....	160
Tabla 20. Distribución de la población según la raza y la edad.....	161
Tabla 21. Distribución de la población según la zona y la edad.....	161
Tabla 22. Distribución geográfica de las granjas y los animales en función del municipio y las zonas.....	163
Tabla 23. Mes, estación del año, temperatura y humedad relativa de recogida de las granjas en el momento del muestreo.....	166
Tabla 24. Registros de densidad, uso de pastos comunales e introducción de animales procedentes de otras ganaderías en las granjas .....	167
Tabla 25. Número de desparasitaciones al año en la población estudiada .....	168
Tabla 26. Distribución de la población según la raza y el número de	

desparasitaciones al año.....	169
Tabla 27. Tratamientos antiparasitarios utilizados en la población estudiada.....	170
Tabla 28. Distribución de las granjas según el fármaco empleado como antiparasitario y el número de desparasitaciones por año.....	170
Tabla 29. Registros de la presentación de casos clínicos en las granjas.....	172
Tabla 30. Distribución de la población estudiada en función del contacto con animales domésticos.....	173
Tabla 31. Distribución de la población estudiada en función del contacto con animales silvestres.....	174
Tabla 32. Valores medios, desviaciones estándar y valores mínimos y máximos de las variables analíticas.....	174
Tabla 33. Distribución de la población de animales en función de los rangos de valores analíticos de la serie roja y plaquetaria.....	175
Tabla 34. Distribución de la población de animales en función de los rangos de valores analíticos de la serie blanca.....	176
Tabla 35. Distribución de la población de animales en función de los rangos de los valores analíticos de los parámetros de la bioquímica.....	176
Tabla 36. Relación entre la amplificación de <i>A. phagocytophilum</i> y la introducción de animales.....	181
Tabla 37. Relación entre la amplificación de <i>A. phagocytophilum</i> y los pastos.....	182
Tabla 38. Relación entre la amplificación de <i>A. phagocytophilum</i> y la presencia de garrapatas.....	182
Tabla 39. Relación entre la amplificación de <i>A. phagocytophilum</i> y la presencia de animales domésticos.....	183
Tabla 40. Relación entre la amplificación de <i>A. phagocytophilum</i> y la presencia de animales silvestres.....	184
Tabla 41. Relación entre la amplificación de <i>A. phagocytophilum</i> y los parámetros hematológicos y bioquímicos sanguíneos.....	185
Tabla 42. Relación entre la amplificación de <i>A. marginale</i> y la raza.....	187
Tabla 43. Relación entre la amplificación de <i>A. marginale</i> y los grupos de edad.....	188
Tabla 44. Prevalencia de <i>A. marginale</i> en los diferentes municipios y granjas muestreados.....	190
Tabla 45. Relación entre la amplificación de <i>A. marginale</i> y el mes de la toma de muestras.....	192
Tabla 46. Relación entre la amplificación de <i>A. marginale</i> y la estación del año.....	192
Tabla 47. Relación entre la amplificación de <i>A. marginale</i> y los pastos.....	194
Tabla 48. Relación entre la amplificación de <i>A. marginale</i> y el evento desparasitar.....	194
Tabla 49. Relación entre la amplificación de <i>A. marginale</i> y	

número de desparasitaciones al año .....	195
Tabla 50. Relación entre la amplificación de <i>A. marginale</i> y el fármaco empleado como antiparasitario.....	196
Tabla 51. Relación entre la amplificación de <i>A. marginale</i> y los casos previo.....	197
Tabla 52. Relación entre la amplificación de <i>A. marginale</i> y la presencia de animales domésticos.....	197
Tabla 53. Relación entre la amplificación de <i>A. marginales</i> y la presencia de animales silvestres.....	198
Tabla 54. Relación entre la amplificación de <i>A. marginale</i> y los parámetros hematológicos y bioquímicos sanguíneos.....	199
Tabla 55. Relación entre la amplificación de <i>B. bigemina</i> y la raza .....	201
Tabla 56. Relación entre la amplificación de <i>B. bigemina</i> y el sexo.....	202
Tabla 57. Relación entre la amplificación de <i>B. bigemina</i> y los grupos de edad.....	202
Tabla 58. Prevalencia de <i>B. bigemina</i> en los diferentes municipios y granjas muestreados... ..	204
Tabla 59. Relación entre la amplificación de <i>B. bigemina</i> y el mes de la toma de muestras.....	206
Tabla 60. Relación entre la amplificación de <i>B. bigemina</i> y los pastos .....	207
Tabla 61. Relación entre la amplificación de <i>B. bigemina</i> y la presencia de garrapatas.....	208
Tabla 62. Relación entre la amplificación de <i>B. bigemina</i> y el evento desparasitar.....	208
Tabla 63. Relación entre la amplificación de <i>B. bigemina</i> y número de desparasitaciones al año.....	209
Tabla 64. Relación entre la amplificación de <i>B. bigemina</i> y el fármaco empleado como antiparasitario.....	210
Tabla 65. Relación entre la amplificación de <i>B. bigemina</i> y la presencia de animales domésticos.....	211
Tabla 66. Relación entre la amplificación de <i>B. bigemina</i> y la presencia de animales silvestres.....	212
Tabla 67. Relación entre la amplificación de <i>B. bigemina</i> y los parámetros hematológicos y bioquímicos sanguíneos.....	213
Tabla 68. Prevalencia de <i>B. divergens</i> en los diferentes municipios y granjas muestreados... ..	217
Tabla 69. Relación entre la amplificación de <i>B. divergens</i> y el mes de la toma de muestras.....	219
Tabla 70. Relación entre la amplificación de <i>B. divergens</i> y la estación del año.....	219



Tabla 71. Relación entre la amplificación de <i>B. divergens</i> y los pastos .....	220
Tabla 72. Relación entre la amplificación de <i>B. divergens</i> y la presencia de garrapatas.....	221
Tabla 73. Relación entre la amplificación de <i>B. divergens</i> y la presencia de animales silvestres.....	223
Tabla 74. Relación entre la amplificación de <i>B. divergens</i> y los parámetros hematológicos y de la bioquímica sanguínea.....	224
Tabla 75. Relación entre la amplificación de <i>T. annulata</i> y la raza .....	226
Tabla 76. Relación entre la amplificación de <i>T. annulata</i> y los grupos de edad .....	227
Tabla 77. Prevalencia de <i>T. annulata</i> en los diferentes municipios y granjas muestreados.....	228
Tabla 78. Relación entre la amplificación de <i>T. annulata</i> y el mes de la toma de muestras.....	230
Tabla 79. Relación entre la amplificación de <i>T. annulata</i> y la introducción de animales.....	232
Tabla 80. Relación entre la amplificación de <i>T. annulata</i> y los pastos.....	232
Tabla 81. Relación entre la amplificación de <i>T. annulata</i> y si desparasitan o no.....	233
Tabla 82. Relación entre la amplificación de <i>T. annulata</i> y número de desparasitaciones al año.....	234
Tabla 83. Relación entre la amplificación de <i>T. annulata</i> y fármaco empleado.....	234
Tabla 84. Relación entre la amplificación de <i>T. annulata</i> y los casos previos .....	235
Tabla 85. Relación entre la amplificación de <i>T. annulata</i> y la presencia de animales domésticos.....	235
Tabla 86. Relación entre la amplificación de <i>T. annulata</i> y la presencia de animales silvestres.....	237
Tabla 87. Relación entre la amplificación de <i>T. annulata</i> y los parámetros hematológicos y de la bioquímica sanguínea.....	238
Tabla 88. Prevalencia de ninguno, uno, dos o tres agentes en los animales del estudio.....	240
Tabla 89. Número de animales con amplificación de ADN de dos agentes simultáneamente en las PCRs empleadas .....	240
Tabla 90. Distribución de los animales positivos a tres agentes amplificados simultáneamente.....	240
Tabla 91. Relación entre la positividad a <i>A. marginale</i> y <i>B. bigemina</i> en los animales del estudio.....	241
Tabla 92. Relación entre la positividad a <i>A. marginale</i> y <i>B. divergens</i> en los animales del estudio.....	241
Tabla 93. Relación entre la positividad a <i>A. marginale</i> y <i>T. annulata</i> en	

los animales del estudio.....	241
Tabla 94. Relación entre la positividad a <i>B. bigemina</i> y <i>B. divergens</i> en los animales del estudio.....	242
Tabla 95. Amplificación de ADN de uno, dos, tres agentes o ninguno en las PCRs realizadas en relación con las razas de los animales .....	243
Tabla 96. Relación entre la detección mediante PCR de ninguno, uno, dos o tres agentes y la granja de procedencia de los animales .....	245
Tabla 97. Relación entre la detección mediante PCR de ninguno, uno, dos o tres agentes y el municipio de procedencia de los animales .....	246
Tabla 98. Relación entre la detección mediante PCR de ninguno, uno, dos o tres agentes y la zona de procedencia de los animales .....	246
Tabla 99. Relación entre la detección mediante PCR de ninguno, uno, dos o tres agentes y el mes de la toma de muestras .....	247
Tabla 100. Relación entre la detección mediante PCR de ninguno, uno, dos o tres agentes y la estación del año.....	248
Tabla 101. Relación entre la detección mediante PCR de ninguno, uno, dos o tres agentes y la introducción de animales .....	249
Tabla 102. Relación entre la amplificación de ADN de ninguno, uno, dos o tres agentes y el uso de pastos compartidos.....	249
Tabla 103. Relación entre la amplificación de ADN de ninguno, uno, dos o tres agentes y la presencia de garrapatas .....	250
Tabla 104. Relación entre la amplificación de ADN de ninguno, uno, dos o tres agentes y el evento desparasitar.....	251
Tabla 105. Relación entre la amplificación de ADN de ninguno, uno, dos o tres agentes y el número de desparasitaciones al año .....	251
Tabla 106. Relación entre la amplificación de ADN de ninguno, uno, dos o tres agentes y los tipos de tratamientos antiparasitarios empleados .....	252
Tabla 107. Relación entre la amplificación de ADN de ninguno, uno, dos o tres agentes y los casos clínicos.....	253
Tabla 108. Relación entre la amplificación de ADN de ninguno, uno, dos o tres agentes y la presencia de animales domésticos .....	254
Tabla 109. Relación entre la amplificación de ADN de ninguno, uno, dos o tres agentes y la fauna silvestre.....	255
Tabla 110. Resultados de la analítica sanguínea de los bovinos en cuyas muestras sanguíneas se detectaron uno, dos o tres agentes, así como de los negativos a todas las PCRs realizadas .....	256



## 1. INTRODUCCIÓN



En la Comunidad de Madrid hay más de 90 mil cabezas de ganado vacuno, entre las que destaca la presencia de 38 mil vacas nodrizas, que son la base del ganado en extensivo. El ganado en estas condiciones de producción está expuesto a enfermedades transmitidas por vectores, siendo a nivel mundial las enfermedades transmitidas por garrapatas las más importantes. En el ganado vacuno estas son, principalmente: ehrlichiosis, anaplasmosis, babesiosis y theileriosis. La importancia económica de las enfermedades transmitidas por garrapatas se ha estimado entre 13.900 y 18.700 millones de dólares anuales y, además, a estas pérdidas hay que añadir que muchas de estas enfermedades son zoonosis que han aumentado en los últimos años.

A pesar de su importancia, no se dispone de datos epidemiológicos de estas enfermedades en el ganado vacuno en la Comunidad de Madrid ni de la repercusión que pueden tener en la salud y, por consiguiente, en la productividad de estos animales. Por tanto, en esta tesis doctoral se ha tratado de determinar la importancia epidemiológica de las anaplasmosis causadas por *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma marginale* y *Anaplasma centrale*; de las babesiosis causadas por *Babesia bigemina* y *Babesia divergens*; así como de la theileriosis causada por *Theileria annulata* en ganado vacuno en extensivo de la Comunidad de Madrid.

Para ello se realizó un análisis de la población de ganado vacuno en extensivo de Madrid para recoger una muestra que fuera representativa de dicha población. A continuación, se recogieron las muestras de sangre de los animales junto con encuestas epidemiológicas de los animales y las granjas donde se encontraban. Posteriormente las muestras sanguíneas se analizaron mediante la técnica molecular de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de forma específica para cada agente estudiado y se realizaron una hematología y una bioquímica sanguínea. Con todos los registros de las encuestas y los resultados de las analíticas sanguíneas y de las pruebas moleculares realizadas, se llevó a cabo un análisis estadístico con el fin de conocer la importancia epidemiológica de estos agentes.



## 2. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA





## 2.1 SISTEMAS EXTENSIVOS DE EXPLOTACIÓN DEL GANADO BOVINO

Dentro de la producción de ganado bovino, así como en otras especies ganaderas, existe una gran variedad de sistemas con ciertos patrones que se han categorizado en varios sistemas de producción. Con mayor frecuencia, estos sistemas se han definido en relación al uso de la tierra por parte del ganado y, en este sentido, la clasificación se hace entre sistemas de pastoreo o extensivo, sistemas mixtos o semiextensivos y sistemas intensivos o sin tierra (Seré y col., 1996, Steinfeld y col., 2006). Este apartado de la revisión bibliográfica de esta tesis doctoral se centra en el sistema de pastoreo o sistema extensivo principalmente, ya que el ganado muestreado en este estudio se encuentra bajo este sistema de producción.

### 2.1.1. LA GANADERÍA EXTENSIVA

Según la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE), el sistema de explotación en extensivo es aquel donde el ganado vive al aire libre y tiene cierta autonomía sobre la selección de la dieta, a través del pastoreo, el consumo de agua y el acceso al refugio. Cuando este sistema se hace mixto o semiextensivo, el ganado se maneja en cualquier combinación de sistemas de producción, tanto intensivos como extensivos, ya sea simultáneamente o de acuerdo con los cambios en las condiciones climáticas o en su estado fisiológico (OIE, 2018). Este tipo de explotaciones, además de estar ligadas a la tierra, ya que dependen de las producciones de los pastos, son explotaciones con baja carga ganadera, poca inversión en infraestructuras y, generalmente, las razas integradas en este sistema son rústicas, adaptadas a las condiciones del medio (Acero Adámed, 2009).

De los 1.500 millones de cabezas de ganado vacuno que hay aproximadamente en el mundo, solo una pequeña fracción se encuentra en intensivo, en parte porque corresponde solo a la etapa final del ciclo de vida del animal, incluso en regiones donde la producción intensiva es común (Steinfeld y col., 2006), lo que conlleva que una gran fracción de ganado vacuno se encuentre en extensivo y semiextensivo con, por tanto, mayor exposición a vectores artrópodos. El *World Livestock Disease Atlas* (2011) analiza, en el periodo de 2006 a 2009, las diez enfermedades más importantes por las pérdidas que producen en cada especie. Para el ganado vacuno encontró que esas enfermedades serían: equinococosis, tuberculosis, leucosis bovina enzoótica, brucelosis, septicemia hemorrágica, fiebre aftosa, rabia, carbunco, dermatosis nodular contagiosa y la theileriosis, todas incluidas en la lista de la OIE (OIE, 2018).

En España hay unos 6,4 millones de bovinos según la última Encuesta Ganadera realizada en noviembre de 2017 (Subdirección General de Estadística, 2017), lo que supone aproximadamente el 7,2% sobre el censo de ganado vacuno de la Unión Europea, que está formado por algo más de 89 millones, ocupando el sexto puesto (Subdirección General de Productos Ganaderos, 2017), y un 0,43% sobre la población mundial de ganado vacuno. Del total del censo español, los animales que se encuentran en extensivo o semiextensivo fundamentalmente son las denominadas vacas nodrizas y bajo esta denominación se encuentran unos dos millones de bovinos de la población nacional (Subdirección General de Productos Ganaderos, 2017), un censo que ha sufrido un incremento continuo, especialmente en el período de 1992 a 2001, donde se pasó de 1,3 millones a cerca de 1,9 millones (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2003). Mientras, en la Unión Europea, entre 2007 y 2014, el número de vacas nodrizas disminuyó en un 4%, de 12,5 a 12 millones de cabezas, donde España representa el 15,2%, solo por detrás de Francia, con el 34,4% (Eurostat, 2015).

Las vacas nodrizas son hembras mayores de 24 meses y menores de 14 años pertenecientes a las razas asturiana de los valles y de la montaña, charolesa, limusina, retinta, avileña-negra ibérica, rubia gallega, morucha, pirenaica, rubia de aquitania, tudanca, lidia, fleckvieh, sus cruces y resto de razas, excluyendo las razas de aptitud típicamente lechera (frisona, armoricaine, bretteonne pie noire, angler, jersey, ayrshire y guernsey). Se trata de vacas destinadas a la producción cárnica, ya que el ternero es la única producción de estos animales y se cría junto a la madre hasta el momento del destete (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2003, Subdirección General de Productos Ganaderos, 2017). Estas vacas se encuentran distribuidas principalmente en el oeste español, desde Galicia hasta Andalucía. También existe un importante censo de estos animales en Asturias y en los Pirineos. El 76,3% de este censo se encuentra localizado en cinco comunidades autónomas: Castilla y León (537.404 vacas, el 26,9% del total), Extremadura (430.105 vacas, el 21,5%), Andalucía (207.299 vacas, el 10,4%), Galicia (204.562 vacas, el 10,2%) y Asturias (147.319 vacas, el 7,4%). Mientras, en la Comunidad de Madrid el censo de vacas nodrizas es de 36.367 animales, un 1,8% del total nacional (Subdirección General de Productos Ganaderos y Dirección general de Producciones y Mercados Agrarios, 2018). En relación a su localización, se distinguen tres zonas: las dehesas, localizadas en el oeste y el suroeste, la región gallega y áreas de montaña (Cantábrico, Pirineos, Sistema Central y Sistema Ibérico) (Acero, 2009).

### **2.1.2. DISTRIBUCIÓN DE LA GANADERÍA EXTENSIVA EN LA COMUNIDAD DE MADRID**

La Comunidad Autónoma de Madrid (CAM) se caracteriza por tener una elevada concentración de habitantes en la corona metropolitana, es decir, en el término municipal de Madrid y términos municipales circundantes, con algo más de cinco millones y medio de personas (el 93,25% de la población total de la Comunidad de Madrid en el 33,5% de su territorio), lo que refleja la presión demográfica sobre esta zona del territorio, con una densidad que supera los mil habitantes por kilómetro cuadrado, a diferencia de otros municipios de la Sierra Norte, con 23,52 habitantes por kilómetro cuadrado (Consejería de Medio Ambiente, Administración Local y Ordenación del Territorio, 2007).

Geográficamente la Comunidad de Madrid se sitúa en el centro de la península, con territorios tan diferentes como el Sistema Central, frente montañoso noroccidental de Madrid, que constituye la sierra, y la depresión de la cuenca del Tajo, o submeseta sur, que ocupa el área central, este y sureste, correspondiente con la parte suroriental. Entre ambas, se encuentra una zona de transición llamada rampa de la sierra o piedemonte que se extiende en paralelo a la sierra desde la confluencia de los ríos Jarama y Lozoya, al norte, hasta el suroeste. Así, el relieve es un factor ambiental importante, que varía entre los 2.429 m del Pico de Peñalara a los 430 m que se dan en el cauce del río Alberche en Villa del Prado, y condiciona el clima.

El clima en Madrid es mediterráneo como en toda la península, pero, al encontrarse la Comunidad lejos del mar, se convierte en un clima mediterráneo continentalizado con temperaturas más extremas. Además, este clima mediterráneo continentalizado se ve influenciado por la altitud, como se ha comentado, dando lugar a veranos más cálidos en zonas de menor altitud y a veranos más frescos en zonas de altitud mayor. Por otro lado, encontramos el clima de montaña en la zona de la sierra de Guadarrama, Somosierra y la parte más oriental de Gredos, que se localizan a mayor altitud, y se caracteriza por bajas temperaturas y precipitaciones elevadas, frecuentemente en forma de nieve. Como consecuencia se da una importante diversidad de ecosistemas y de especies de flora y fauna que se traduce en espacios naturales protegidos que suponen alrededor del 14% del territorio (Consejería de Medio Ambiente, Administración Local y Ordenación del Territorio, 2007).

Los núcleos urbanos, la geografía y el clima influyen en la distribución del ganado en la Comunidad de Madrid, lo que hace que el ganado se concentre en una franja que va del suroeste al noreste, principalmente en la zona de la sierra y la rampa, con alrededor del 70% del ganado vacuno de la región. El censo de ganado vacuno en noviembre de 2017 fue de 93.720 animales (Subdirección General de Estadística, 2017), tal y como puede observarse en la **Tabla 1**. La mayor parte corresponde a vacas de dos o más años que no son de producción láctea (“Resto”) con 38 mil animales, seguido de casi 17 mil animales menores de 12 meses destinados a sacrificio.

Animales menores de 12 meses			Animales de 12 a 24 meses			Animales de dos o más años				
Destinados a sacrificio	Otros		Machos	Hembras para		Machos	Novillas		Vacas	
	Machos	Hembras		Sacrificio	Reposición		Sacrificio	Resto	Leche	Resto
16.681	5.905	8.454	3.888	4.815	4.708	3.812	80	1.419	5.914	38.044

Tabla 1. El censo de ganado bovino de la Comunidad de Madrid es de 93.720, clasificado según la edad de los animales, el sexo y el destino, sacrificio o reposición (Subdirección General de Estadística, 2017)

Según el estudio del sector español de vacas nodrizas realizado en febrero de 2018, 36.367 se clasifican como vacas nodrizas, que se acerca a esos 38 mil animales que la encuesta ganadera clasifica como “Resto” en la categoría de animales de dos o más años. El 68% de este tipo de ganado se encuentra en esa franja de concentración ganadera de la sierra y piedemonte, donde se localiza la mayor parte del ganado de la Comunidad de Madrid (San Miguel y col., 2009). En estas zonas también se presenta la mayor cantidad de montes de utilidad pública, donde estos animales suelen pastar (**Imagen 1**) (Conserjería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio de la Comunidad de Madrid, 2007).

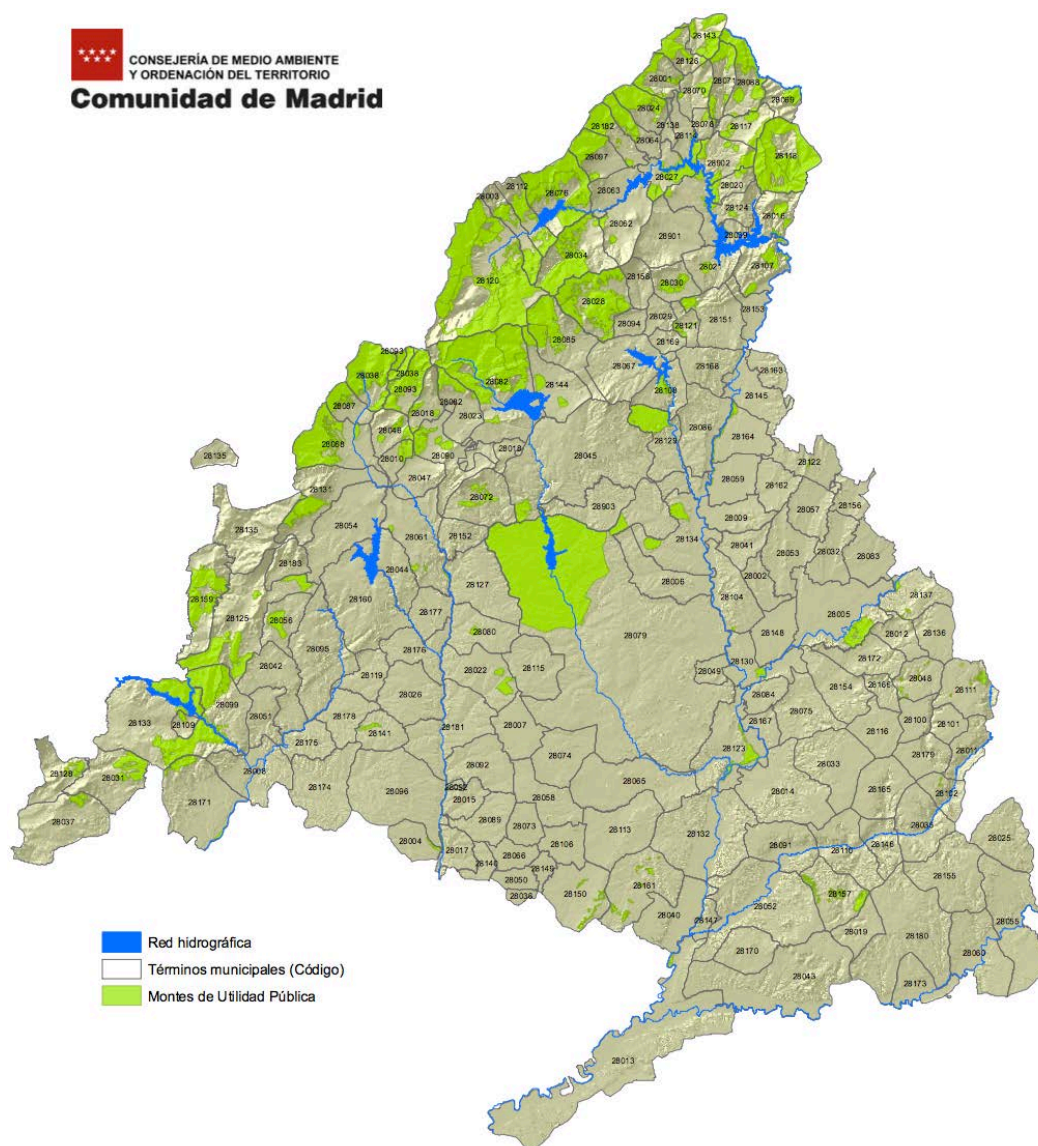


Imagen 1. Montes de utilidad pública en la Comunidad de Madrid (Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio de la Comunidad de Madrid, 2007)

Las vacas nodrizas de la Comunidad de Madrid presentan una media de edad de 6,73 años y son en su mayoría animales cruzados, conjunto mestizo (20.017 animales), lo que supone el 55% de la población, seguidos por la raza de lidia (5.123 vacas) y la avileña-negra ibérica (3.296 animales), con el 14,1% y el 9,1% respectivamente (Subdirección General de Productos Ganaderos y Dirección general de Producciones y Mercados Agrarios, 2018).

En el caso concreto del ganado vacuno de leche, constituido fundamentalmente por ganado frisón, la mayor parte (aproximadamente el 59%) se encuentra también en estas zonas de concentración del ganado, aunque también se presenta alrededor de un 23% en la parte este y sudeste de la Comunidad, en la submeseta, donde además se concentra la mayor parte de la agricultura que se desarrolla en Madrid, con unos 1.450

km<sup>2</sup> de los 2.300 km<sup>2</sup> que se dedican al cultivo (lo que supone un 30% de la superficie total) (San Miguel y col., 2009).

## **2.2. ENFERMEDADES VECTORIALES DEL BOVINO**

---

Garrapatas, pulgas y otros artrópodos hematófagos han estado implicados como vectores y reservorios de agentes que afectan la salud humana y animal y los cambios ambientales han tendido a exacerbar la incidencia y prevalencia de las enfermedades que transmiten. Así, las enfermedades transmitidas por vectores son responsables del 22,8% de los eventos registrados como enfermedades infecciosas emergentes entre 1940 y 2004, según Jones y colaboradores (2008), y el 28,8% se han producido en la última década, incremento atribuido al cambio climático. No obstante, debe considerarse que se cree que la emergencia o re-emergencia de las enfermedades transmitidas por vectores está impulsada en gran medida por factores socioeconómicos, además de por factores ambientales y ecológicos. Estos factores vienen determinados por los cambios globales en el medio ambiente y el hábitat, como la urbanización, el desarrollo económico, el clima y el desarrollo de recursos hídricos, incluidos el regadío y la deforestación. Todos estos factores, derivados de las actividades humanas, modifican enormemente el paisaje y las condiciones ambientales, lo que conlleva un gran impacto en la alteración de las asociaciones faunísticas, facilitando la entrada en contacto con vectores artrópodos y produciendo circunstancias que sirven de base para la aparición de infecciones transmitidas por vectores. También habría que tener en cuenta los efectos de los conflictos civiles y las migraciones, así como la interrupción o la destrucción de los servicios de salud, que han conducido a la reducción o la ausencia de vigilancia epidemiológica, por lo que se pueden originar epidemias o un aumento de las enfermedades endémicas (Molyneux, 1998, Telford III y Goethert, 2004, Caminade y col., 2018).

Las garrapatas fueron los primeros artrópodos que se describieron como vectores de patógenos y actualmente son reconocidos, junto con los mosquitos, como los principales vectores artrópodos de agentes patógenos para humanos y animales en todo el mundo (Jongejan y Uilenberg, 2004, Dantas-Torres y col., 2012). Se trata de artrópodos hematófagos que parasitan todas las clases de vertebrados y son capaces de transmitir una amplia gama de agentes, entre los que se incluyen protozoos, virus y bacterias, así como desempeñar un papel importante en el mantenimiento de estos agentes en la naturaleza como reservorios, lo que ha hecho que aumente el interés en las enfermedades transmitidas por garrapatas en los últimos años (Parola y Raoult, 2001). Además, se distribuyen desde el Ártico hasta las regiones tropicales, donde cada



especie de garrapata tiene condiciones ambientales y biotopos preferidos que determinan su distribución geográfica. Sin embargo, esta distribución no es estática, ni espacial ni temporalmente, a medida que las condiciones favorables para las garrapatas se expanden o se contraen. Los fenómenos meteorológicos transitorios en áreas endémicas, como puede ser un invierno húmedo y templado no habitual, pueden extender el número de meses que las garrapatas están activas. Del mismo modo, el cambio climatológico prolongado o permanente puede transformar áreas previamente no endémicas en un hábitat favorable para las garrapatas, por ejemplo al incrementarse la temperatura en un área a mayor altitud o latitud. Igualmente, los cambios físicos en un área a través de la invasión humana o la modificación del hábitat de las garrapatas existentes pueden aumentar el contacto entre garrapatas e individuos susceptibles, facilitando cambios en el comportamiento con sus hospedadores habituales (Fritz, 2009). Por otra parte, y como consecuencia de estos cambios, la incidencia de las enfermedades transmitidas por garrapatas está aumentando en los últimos años, muchas de las cuales son zoonosis importantes, como anaplasmosis, babesiosis, ehrlichiosis y borreliosis, por lo que están ganando cada vez más atención por parte de médicos y veterinarios (Telford III y Goethert, 2004, Dantas-Torres y col., 2012).

La reducción y el control de poblaciones de garrapatas y, por tanto, de las enfermedades que transmiten, son complicados, debido en parte a que las estrategias para el control de garrapatas mediante modificaciones en su hábitat, como el manejo de la vegetación mediante corte, quema y tratamiento con herbicidas o el drenaje de áreas húmedas, tienen un efecto a corto plazo y pueden causar daños ecológicos graves. Por otro lado, el uso de organofosforados o piretroides combinados con feromonas en áreas concretas puede causar contaminación ambiental y toxicidad en animales y personas. Los acaricidas también se pueden aplicar directamente en los hospedadores vertebrados, pero su uso continuado como método de control contra las garrapatas ha resultado en una selección de poblaciones resistencias, junto con la contaminación del medio ambiente y productos de origen animal (Parola y Raoult, 2001, Ghosh y col., 2006). Las vacunas contra garrapatas y los métodos de control biológicos también están disponibles, pero son estrategias que están en desarrollo. Las vacunas constituyen un enfoque eficaz y ambientalmente racional. Sin embargo, la identificación de antígenos protectores sigue siendo el paso limitante en el desarrollo de vacunas, a lo que se añade la dificultad de que sean eficaces contra múltiples especies de garrapatas (de la Fuente y Kocan, 2006). El control biológico se ha enfocado en el reconocimiento de los enemigos naturales de las garrapatas como depredadores naturales (incluyendo escarabajos, arañas y hormigas), parásitos (insectos, ácaros y



nematodos), hongos y bacterias, pero solo unas pocas especies han sido evaluadas como agentes de control y la mayoría tienen un potencial limitado, al ser depredadores generalistas (Samish y col., 2004). En la actualidad, el control de garrapatas se basa en la combinación y rotación de acaricidas, junto al conocimiento ecológico y epidemiológico de estos artrópodos y sus enfermedades asociadas en un área concreta, con la debida consideración a sus efectos ambientales (Parola y Raoult, 2001, Rodriguez-Vivas y col., 2018).

Desde el punto de vista de la salud animal, las enfermedades transmitidas por garrapatas en los rumiantes domésticos son las más importantes, aunque las que afectan a los animales de compañía, especialmente a perros y caballos, no son insignificantes. En 1984, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) estimó en unos siete mil millones de dólares las pérdidas anuales totales causadas por las garrapatas y las enfermedades transmitidas por garrapatas en el mundo y agregó que las pérdidas podrían ser mucho más altas (Uilenberg, 1995). En un análisis posterior realizado en 1997, los costes globales de las enfermedades transmitidas por garrapatas se estimaron entre 13.900 y 18.700 millones de dólares anuales. En este análisis se tuvo en cuenta que el 80% de la población mundial de ganado vacuno vive en áreas de riesgo y que el coste estimado por cabeza de ganado a precios de 1996 fue de 13 a 18 dólares (de Castro, 1997). Por tanto, las enfermedades transmitidas por garrapatas limitan el desarrollo de las industrias ganaderas en todo el mundo, especialmente en áreas tropicales y subtropicales, pero también son frecuentes en muchas áreas templadas, como el norte de Europa. Económicamente las más importantes en los rumiantes a escala global, llamadas "las cuatro grandes", son theileriosis, babesiosis, anaplasmosis y *heartwater* (también llamada *cowdriosis*). Esta última, la *cowdriosis* o *heartwater*, causada por *Ehrlichia ruminantium* se limita al África subsahariana, las islas de Madagascar y Comoras y algunas islas del Caribe (Uilenberg, 1995).

En Europa, el ganado bovino está afectado por la anaplasmosis causada por *Anaplasma phagocytophilum* y *Anaplasma marginale*, la babesiosis causada por *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Babesia divergens* y la theileriosis causada por *Theileria annulata*, que abarca principalmente la cuenca mediterránea (Uilenberg, 1995, L'Hostis y Seegers, 2002, Bock y col., 2004). Todos estos agentes también han sido descritos en España (Juste y col., 1989, Habela y col., 2002, Sevilla y col., 2002). Sin embargo, en la zona centro, donde los veterinarios clínicos describen la frecuente ocurrencia de enfermedades transmitidas por garrapatas en ganado vacuno, principalmente anaplasmosis y piroplasmosis, no se tienen datos sobre la prevalencia actual ni sobre el papel potencial que estos patógenos pueden tener en el bienestar

animal y su productividad.

Debido a todo esto, con esta tesis doctoral se ha tratado de analizar el papel que juegan las anaplasmosis y piroplasmosis en el ganado bovino más expuesto a sus vectores (ganado en extensivo) en la Comunidad de Madrid. Para ello se ha evaluado tanto la prevalencia de estos agentes y relaciones epidemiológicas como el efecto que sobre la salud del animal pueden tener.

### **2.2.1. ANAPLASMOSIS**

Las anaplasmosis son un grupo de enfermedades de transmisión vectorial causadas por bacterias gram-negativas intracelulares obligadas del género *Anaplasma*, con un impacto notable en la salud humana y animal (Dahlgren y col., 2011, Atif, 2015). Taxonómicamente, el género *Anaplasma* se incluye en la familia *Anaplasmataceae*, que, a su vez, se engloba dentro del filo *Proteobacteria*, orden *Rickettsiales*. La familia *Anaplasmataceae* incluye los géneros *Ehrlichia*, *Anaplasma*, *Neorickettsia*, *Neoehrlichia*, *Aegyptianella* y *Wolbachia* (Dumler y col., 2001, Rikihisa y col., 2003).

Las bacterias implicadas en las anaplasmosis son alfa-proteobacterias con forma cocoide a elipsoidal, a menudo pleomórficas, no móviles, que residen en el interior de vacuolas en el citoplasma de las células eucariotas de su hospedador. Se han detectado con mayor frecuencia en células de la sangre periférica derivadas de precursores de la médula ósea, aunque encontramos diferencias en el tipo concreto de célula que infectan y en sus características morfológicas (Theiler, 1910, Dumler y col., 2001). En el interior de sus células diana aparecen como inclusiones intracelulares que se tiñen de azul oscuro a púrpura con tinciones Romanowsky, Giemsa o Diff-Quik (Rikihisa, 1991, Dumler y col., 2001).

El ciclo de vida de anaplasma involucra a los vertebrados y a las garrapatas ixódidas, con una replicación por fisión binaria en ambos (Rikihisa, 1991). Los hospedadores vertebrados se consideran reservorios de estas bacterias porque pueden desarrollar infecciones persistentes y actuar como una fuente de infección para las garrapatas (Kieser y col., 1990, Kocan y col., 1992, Castro y col., 2001). Las garrapatas ixódidas pueden transmitir *Anaplasma* spp. de un estadio a otro después de la muda, de larvas a ninfas y de ninfas a adultos, pero no transovariamente (MacLeod y Gordon, 1933).

Centrándonos en el género *Anaplasma*, tras la reorganización y ampliación del mismo llevada a cabo por Dumler y colaboradores en 2001, en él se incluyen las siguientes especies:

- *Anaplasma marginale*, *Anaplasma centrale* y *Anaplasma ovis*,
- *Anaplasma phagocytophilum*, previamente subdividida en *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia phagocytophila* y la ehrlichia granulocítica humana (o HGE, de sus siglas en inglés *human granulocytic ehrlichia*) (Dumler y col., 1995),
- *Anaplasma bovis* y *Anaplasma platys* (antes incluidas en el género *Ehrlichia*).

Recientemente, se han incorporado nuevas posibles especies al género *Anaplasma*:

- *Anaplasma* sp. Japón. La identificación inicial en ciervos, ganado vacuno y garrapatas de la especie *Haemaphysalis megaspinosa* en Japón de fragmentos de ADN muy relacionados con *A. phagocytophilum*, pero aparentemente independiente de las cepas de *A. phagocytophilum* estadounidenses y europeas, condujo a la descripción de una nueva especie de anaplasma relacionada con *A. phagocytophilum* (Kawahara y col., 2006, Ooshiro y col., 2009, Yoshimoto y col., 2010, Ybañez y col., 2012).
- *Ehrlichia-like* sp. o agente del ciervo de cola blanca (o WTD, de sus siglas en inglés *White-tailed deer agent*), aislada de ciervos de la especie *Odocoileus virginianus* (Allsopp y col., 1997). Basándose en características biológicas, antigénicas y genéticas, este patógeno se considera una especie nueva y se ha propuesto para ella el nombre de *Anaplasma odocolei* sp. nov.. Este agente infecta plaquetas y los análisis filogenéticos confirmaron que se relaciona con *A. platys* (Tate y col., 2013).
- *Anaplasma capra*. Esta especie, denominada así provisionalmente, fue identificada por primera vez en cabras asintomáticas en China (Liu y col., 2011). También se ha identificado en ovejas y en el serau japonés (*Capricornis crispus*), y parece que puede estar ampliamente distribuida en China. Asimismo, recientemente se ha sugerido que puede tratarse de un patógeno para el hombre (Li, Zheng, Ma y col., 2015). Su transmisión es llevada a cabo por *Ixodes persulcatus* y *Haemaphysalis qinghaiensis* (Sato y col., 2009, Yang y col., 2017, Yang y col., 2018).
- *Anaplasma* sp. (Omatjenne), genéticamente cerca de *E. ruminantium* y *A. platys*. Esta especie poco conocida de anaplasma se aisló inicialmente en garrapatas *Hyalomma truncatum* y en cabras sanas (Allsopp y col., 1997). Posteriormente se ha aislado en otros rumiantes silvestres y domésticos, entre los que se incluyen vacas (Aktas y col., 2011, Lorusso y col., 2016, Teshale y col., 2018) y perros (Adamu y col., 2014).

- *Anaplasma* sp. BL126-13 y *Anaplasma* sp. JC3-6. Ambas especies han sido identificadas en rumiantes silvestres y domésticos en China y parece que aún no se encuentran bien caracterizadas, pero parecen ocurrir con relativa frecuencia, especialmente en las cabras (Kang y col., 2014, Li y col., 2014, Li, Zheng y col., 2015).

Los efectos de las anaplasmosis sobre la salud y la productividad de los animales domésticos se conocen desde hace más de un siglo y siguen siendo hoy en día una causa importante de pérdidas económicas en la ganadería, tanto en regiones tropicales como templadas (Theiler, 1910, Kocan y col., 2003). Además, los rumiantes, domésticos y salvajes, representan en la mayoría de los casos, la clave en la epidemiología del género *Anaplasma*, al actuar como huéspedes definitivos o como reservorios de la infección (Zobba y col., 2014).

Concretamente, la **anaplasmosis bovina** puede estar causada por varias especies de anaplasma, como son: *A. phagocytophilum*, *A. marginale*, *A. centrale* y *A. bovis*. Además, se ha aislado *A. ovis*, que normalmente infecta a ovejas, cabras y rumiantes silvestres, en estudios epidemiológicos en ganado bovino realizados en Turquía, no habiéndose descrito previamente en la bibliografía (Aktas y col., 2011). Asimismo, se ha detectado en el vacuno *A. platys* (Dahmani y col., 2015) y una especie altamente relacionada (*A. platys-like*), que parece parasitar a los neutrófilos (Liu y col., 2011, Zobba y col., 2014, Gioia y col., 2018).

De entre estas especies que pueden afectar a la vaca, *A. phagocytophilum* se detecta con mayor frecuencia en granulocitos (principalmente en neutrófilos maduros circulantes), las especies *A. marginale*, *A. centrale* y *A. ovis* infectan a los eritrocitos, mientras que *A. bovis* infecta a los monocitos, pudiendo ser asintomática, aunque también puede causar signos clínicos, como anorexia, debilidad, fiebre, incoordinación, mucosas pálidas y aumento de los nódulos linfáticos e, incluso, la muerte (Dumler y col., 2001, Rar y Golovljova, 2011).

A continuación, nos centraremos en la revisión de aquellas especies del género que son de interés para el desarrollo de esta tesis doctoral.

#### **2.2.1.1. *Anaplasma phagocytophilum***

*Anaplasma phagocytophilum* es el agente causal de la fiebre transmitida por garrapatas (o TBF de sus siglas en inglés, *tick-borne fever*), la fiebre de los pastos o

anaplasmosis granulocítica bovina, y se ha reconocido como patógeno de rumiantes domésticos (ovejas, cabras y vacas) y rumiantes silvestres en Europa desde hace más de 80 años, siendo probablemente infradiagnosticada en el ganado (Woldehiwet, 2006, Dugat y col., 2015). Actualmente se conoce que se trata de un agente de distribución mundial (Stuen y col., 2013).

Aunque existe un número limitado de datos, se acepta comúnmente que la anaplasmosis granulocítica en los rumiantes domésticos tiene un importante impacto económico en Europa, cuyas principales pérdidas económicas se asocian con los abortos del ganado y con la drástica reducción de la producción de leche (Pusterla y Braun, 1997, Stuen y col., 2013, Dugat y col., 2015). En ovino se ha estimado que *A. phagocytophilum* puede causar pérdidas directas por la muerte de corderos e indirectas por la reducción de su crecimiento. Por lo tanto, existe una buena justificación económica y de bienestar para su control (Brodie, 1985, Stuen y col., 2002, Woldehiwet, 2006, Grøva y col., 2011). Además de las pérdidas económicas en el ganado, *A. phagocytophilum* es capaz de infectar a otras especies animales, como perros, caballos o roedores, y causa una enfermedad zoonótica emergente cada vez más frecuente y reconocida tanto en Europa como en Estados Unidos y Asia, la anaplasmosis granulocítica humana (o HGA, de sus siglas en inglés, *human granulocytic anaplasmosis*), por lo que este agente adquiere un mayor peso por su importancia en la salud pública. La enfermedad generalmente se considera que cursa con síntomas leves, pero, en algunos casos, especialmente en individuos con un sistema inmunitario debilitado, puede ser fatal (Blanco y Oteo, 2002, Dumler y col., 2005).

*A. phagocytophilum* se describió por primera vez en 1940 como el agente causal de una enfermedad transmitida por garrapatas que había sido observada en ovejas de Escocia ocho años antes durante un estudio experimental sobre *louping-ill*. En el desarrollo de dicho estudio se descubrió que las ninfas de *Ixodes ricinus* no alimentadas recolectadas de los pastos donde se habían dado casos de *louping-ill* eran capaces de causar una reacción febril aguda en las ovejas. Esta fiebre no se consideró debida a la infección por *louping-ill*, ya que después de la recuperación, los animales no presentaban inmunidad a esta enfermedad (MacLeod y Gordon, 1933, Woldehiwet, 2006). Por esa reacción febril causada por las garrapatas la enfermedad recibió el nombre provisional de fiebre transmitida por garrapatas y se supuso que el patógeno responsable era una *Rickettsia*. Como anécdota, comenta Stuen que el sinónimo noruego para referirse a la fiebre transmitida por garrapatas es *sjodogg*, utilizado para describir una enfermedad devastadora en rumiantes descrita en el año 1780 en una zona costera del oeste de Noruega (Stuen, 1998).

En España, Juste y colaboradores identificaron este agente por primera en el País Vasco, durante el curso de unos experimentos sobre infecciones en ovejas transmitidas por garrapatas. En 1989, este mismo autor describe una enfermedad atípica en bovinos españoles mediante la identificación de la presencia de anticuerpos IgM frente a *Cytoecetes phagocytophila* (*A. phagocytophilum*), no habiéndose reconocido el papel de la TBF en la patología de los rumiantes en pastoreo en España hasta ese momento (Juste y col., 1986, Juste y col., 1989).

Después del uso inicial del nombre *Rickettsia phagocytophila*, el organismo recibió el nombre de *Cytoecetes phagocytophila*, para reflejar su predilección por los granulocitos y por su similitud morfológica con *Cytoecetes microti*. En 1974, el organismo pasó a denominarse *Ehrlichia phagocytophila* en el Manual de Bacteriología Sistemática de Bergey, y los descubrimientos posteriores de *E. chaffeensis* (agente causante de la ehrlichiosis monocítica humana) y del agente de la HGE propiciaron el inicio de nuevos estudios del genogrupo *Ehrlichia phagocytophila*. Así, el género *Ehrlichia* se dividió en tres genogrupos, de los cuales el grupo granulocítico contenía *E. phagocytophilum*, *E. equi* y el agente causante de la HGE (Philip, 1974, Foggie, 1951, Anderson y col., 1991, Chen y col., 1994, Ogden y col., 1998, Stuenkel y col., 2013, Battilani y col., 2017). Más tarde, se propuso una reclasificación del género *Ehrlichia*, y en base a estudios filogenéticos, el grupo *Ehrlichiae* granulocítico pasó a llamarse *Anaplasma phagocytophilum*, nombre que agrupa actualmente a las tres especies de bacterias granulocíticas, *Ehrlichia phagocytophila*, *Ehrlichia equi* y al agente causante de la HGE, como se ha comentado anteriormente (Dumler y col., 2001).

- Bacteriología y epidemiología

Esta bacteria intracelular obligada, cocobacilar, con un tamaño de 0,3 a 1,3  $\mu\text{m}$  de diámetro y hasta 2  $\mu\text{m}$  de longitud, infecta principalmente a neutrófilos y es capaz de crecer *in vitro* en la línea celular de leucemia humana HL60, así como en las líneas celulares de garrapatas *Ixodes scapularis* embrionarias (Foggie, 1951, Goodman y col., 1996, Rikihisa, 2011). *A. phagocytophilum* puede sintetizar todos los nucleótidos, la mayoría de las vitaminas y cofactores, incluida la biotina, lo que sugiere que no es necesario que compita con la célula hospedadora y que, incluso, puede suministrar a estas células vitaminas esenciales y nucleótidos (Dunning y col., 2006). Sin embargo, son dependientes de la incorporación de colesterol exógeno a sus membranas, al carecer de los genes requeridos para la biosíntesis de lipopolisacáridos y peptidoglicanos, siendo este hecho importante para evitar la respuesta inmunitaria innata en las células hospedadoras, tanto en animales como en garrapatas, eliminando



la posibilidad de desencadenar respuestas para eliminar los microorganismos invasores (Lin y Rikihisa, 2003).

*A. phagocytophilum* puede ser **transmitida** por 14 especies de garrapatas e infectar a 30 especies de vertebrados (de la Fuente, Estrada-Pena y col., 2016). Concretamente, se transmite biológicamente por garrapatas ixódidas, distribuyéndose de forma mayoritaria en el hemisferio Norte, siendo en Estados Unidos los principales vectores *Ixodes scapularis* e *Ixodes pacificus*, mientras que en Europa encontramos como principal vector a *Ixodes ricinus* y en Asia a *Ixodes persulcatus* (MacLeod y Gordon, 1933, Rar y Golovljova, 2011). Sin embargo, en zonas donde estos vectores principales son escasos, *A. phagocytophilum* parece que puede ser transmitida por otras especies del género *Ixodes*, como *I. trianguliceps* o *I. spinipalpis* que tienen un papel importante en la transmisión y mantenimiento de *A. phagocytophilum* en roedores. Incluso se ha sugerido que otros géneros de garrapatas podrían participar en su transmisión, al haberse detectado ADN de este patógeno en garrapatas *Dermacentor*, *Hyalomma*, *Amblyomma*, *Haemaphysalis* o *Rhipicephalus*. Sin embargo, la competencia como vector de muchas de las especies de garrapatas en las que se ha detectado *A. phagocytophilum* aún no ha podido ser aclarada (Ogden y col., 1998, DeNatale y col., 2002, Bown y col., 2003, de la Fuente, Naranjo y col., 2004, Stuenkel y col., 2013, Palomar y col., 2015).

Las garrapatas ixódidas son capaces de transmitir *A. phagocytophilum* de forma transtádica, ya que las bacterias sobreviven al proceso de muda e infectan a nuevos hospedadores durante la siguiente alimentación. La transmisión transovárica es inexistente o ineficiente, si bien ha sido descrita en *Dermacentor albipictus* (MacLeod y Gordon, 1933, Ogden y col., 1998, Bown y col., 2003, Baldrige y col., 2009, Rar y Golovljova, 2011, Kocan y col., 2012).

La transmisión mecánica, mediante la inoculación de sangre o productos sanguíneos, no parece desempeñar un papel importante en la transmisión de *A. phagocytophilum* (Kocan y col., 2015).

Recientemente, se ha demostrado la transmisión transplacentaria de *A. phagocytophilum* en bovinos infectados experimental y naturalmente. Aunque no se ha determinado el impacto de este modo de transmisión, se considera poco probable que contribuya marcadamente a la epidemiología general de *A. phagocytophilum* (Pusterla y Braun, 1997, Henniger y col., 2013, Kocan y col., 2015). Además, en leucocitos de muestras de leche de vacas lactantes durante la fase aguda de la enfermedad, también

se ha identificado *A. phagocytophilum*. Sin embargo, la infección por la ingestión de leche no parece probable (Pusterla, Huder y col., 1997).

*A. phagocytophilum* causa infecciones en un amplio rango de **hospedadores** mamíferos, entre los que se incluye el bovino y el hombre, pero las diferentes cepas tienen diferente predilección por el hospedador y no todas las cepas pueden infectar a todos los hospedadores, como se ha demostrado en experimentos de infección cruzada (Pusterla, Nicola y col., 2001, Stuen, Bergström y col., 2003, Foley y col., 2008, Bown y col., 2009, Katargina y col., 2012, Stuen y col., 2013). En este sentido, se ha intentado reproducir la enfermedad clínica y la bacteriemia en ganado bovino con las variantes norteamericanas causantes de la HGA y equina sin éxito, ya que no se observaron hallazgos clínicos o hematológicos anormales ni cuerpos de inclusión dentro de los granulocitos en el ganado después de la inoculación, y los resultados de todas las pruebas de PCR fueron negativos (Pusterla, Nicola y col., 2001).

Asimismo, en base a los estudios de caracterización molecular realizados, se ha comprobado la existencia de una gran variabilidad genética en esta especie, por lo que actualmente se trata de dilucidar el papel de estas variaciones en los diferentes **ciclos epidemiológicos** descritos, a través de enfoques moleculares basados en la secuencia de *locus* único y técnicas de secuencia multilocus (Stuen y col., 2013, Dugat y col., 2014, Battilani y col., 2017).

Los marcadores utilizados con mayor frecuencia en estos estudios moleculares que han evaluado la variabilidad genética de este agente son el *locus* 16S del ARNr, el operón *groESL*, los genes *ankA*, *msh2* y *msh4*. Si bien cada vez más autores consideran que el gen 16S ARNr muestra una pobre resolución como marcador, recomendando el uso de otros genes para un análisis más completo de las variantes genéticas. Sin embargo, éste ha sido el gen más utilizado tradicionalmente para genotipar cepas de *A. phagocytophilum*. En base a estos análisis se han llegado a definir hasta 15 variantes en Estados Unidos, entre las que se incluyen las variantes Ap-V1 y Ap-ha, que pueden coexistir en las mismas áreas geográficas y están involucradas en dos ciclos epidemiológicos (Massung y col., 2002, Courtney y col., 2003, Rar y Golovljova, 2011). La variante Ap-ha infecta a humanos, perros y caballos, mientras que los roedores son considerados los reservorios. En otro ciclo epidemiológico secundario, la variante Ap-V1, que parece tener un potencial patogénico bajo y podría estar restringida únicamente a especies rumiantes, implica al ciervo de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) como reservorio, no pudiendo infectar ni a roedores ni a humanos. Mientras que los rumiantes domésticos pueden ser infectados experimentalmente por



esta variante, en concreto no se han producido casos de anaplasmosis granulocítica bovina en Estados Unidos (Massung y col., 2003, Massung y col., 2005, Dugat y col., 2015). En Europa, se identifican variantes Ap-V1 y Ap-ha en varias especies de rumiantes silvestres (Dugat y col., 2015). Los ciclos epidemiológicos no están tan bien definidos como en Estados Unidos y difieren en que infectan a los rumiantes domésticos con mayor frecuencia y causando enfermedad clínica, mientras que otras variantes, que parecen tener homología con la variante Ap-ha de Estados Unidos, se han detectado en humanos, caballos, perros y gatos (de la Fuente, Massung y col., 2005, Scharf y col., 2011, Silaghi y col., 2011, Silaghi, Liebisch y col., 2011). Entre los **reservorios** de las variantes europeas de *A. phagocytophilum* se encuentran el ciervo rojo (*Cervus elaphus*) (Stuen y col., 2001), el corzo (*Capreolus capreolus*) (Alberdi y col., 2000), la oveja (Stuen y col., 2010, Thomas y col., 2012), el jabalí (*Sus scrofa*), el erizo (*Erinaceus europaeus*) (Silaghi y col., 2012, Silaghi y col., 2014) y varias especies de pequeños mamíferos y roedores, aunque su papel como reservorios no está claro (Liz y col., 2000, Liz, 2002, Barandika y col., 2007).

Por tanto, *A. phagocytophilum* comprende distintos linajes genéticos y ecotipos, que difieren en patogenicidad, predilección del hospedador y reservorios.

El mantenimiento del **ciclo biológico** de esta bacteria en la naturaleza depende de su capacidad para permanecer en el hospedador vertebrado entre temporadas de actividad de las garrapatas, al no presentar transmisión transovárica. En este sentido, se ha demostrado que la sangre de una oveja podría ser infecciosa para otra oveja susceptible durante un período variable de uno a dos años tras la infección primaria, permaneciendo así como animales portadores durante el periodo de no actividad de la garrapatas. Estas infecciones persistentes se caracterizan por un período definido de bacteriemia primaria seguida de ciclos recurrentes de bacteriemia intercalados con períodos de duración variable en los que se ha descrito la imposibilidad de detección del ADN bacteriano. Asimismo, estos animales pueden sufrir reinfecciones o superinfecciones con *A. phagocytophilum* que participan en este ciclo de mantenimiento del agente en la naturaleza (Foggie, 1951, Tuomi, 1967, Ogden y col., 2002, Thomas y col., 2012).

Además, debe tenerse en cuenta que el movimiento de los hospedadores vertebrados o de las garrapatas infectadas en mamíferos o aves migratorias pueden diseminar la bacteria. Los animales domésticos, incluidos los animales de compañía, pueden ser transportados a otras áreas, países e, incluso, continentes y, por lo tanto, también pueden aumentar la propagación de la infección (Stuen y col., 2013). En este

sentido, se ha sugerido por algunos autores que las aves también pueden tener un papel importante en el mantenimiento de la infección en determinadas zonas, al favorecer la dispersión de garrapatas a largas distancias (Bjöersdorff y col., 2001, de la Fuente, Naranjo y col., 2005, Stuen 2007, Hildebrandt y col., 2010, Palomar y col., 2012).

- *Situación en España*

Desde la primera descripción en ganado vacuno de Juste y colaboradores en 1989, se han realizado algunos estudios de anaplasmosis en el bovino en diferentes regiones de España. En Galicia, la seroprevalencia de *A. phagocytophilum* en la población bovina fue del 3,07% en 2006, con una mayor detección de animales seropositivos en Pontevedra (Amusategui y col., 2006). En este mismo estudio también se determinaron seroprevalencias en ovejas del 0,51% y en cabras del 0,48%, en todos los casos ellos con un bajo título de anticuerpos (Amusategui y col., 2006). En estudios moleculares se han descrito prevalencias en el bovino del 0% en Cádiz (de la Fuente y col., 2008) y el 19% en Ciudad Real (de la Fuente, Naranjo y col., 2005). En la misma línea, un estudio realizado con muestras de Castilla-La Mancha y de Sicilia la prevalencia de infección por *A. phagocytophilum* fue de un 13% (Naranjo y col., 2006).

Además, se ha identificado este agente en rumiantes silvestres en numerosos estudios. En concreto se ha detectado en: corzos (*Capreolus capreolus*), con una prevalencia entre el 38 y el 61% en el norte de España y el 18% en Cádiz; en ciervo rojo (*Cervus elaphus*), del 23,8 al 80,7% en el norte de España y el 100% en Castilla-La Mancha; y en el gamo (*Dama dama*), con una prevalencia del 50% en el mismo estudio llevado a cabo en el norte de España, en el País Vasco y Asturias, de García-Pérez y colaboradores (Oporto y col., 2003, Naranjo y col., 2006, de la Fuente y col., 2008, Portillo y col., 2011, García-Pérez y col., 2016).

- Patogenia y respuesta inmunitaria

El desarrollo de *A. phagocytophilum* es complejo y se coordina con el ciclo de alimentación de su vector biológico. La infección y la colonización de las garrapatas se produce tras un breve periodo de alimentación en el hospedador vertebrado, al ingerir la garrapata células sanguíneas infectadas, principalmente neutrófilos, si bien se ha descrito que, en ausencia de neutrófilos circulantes infectados, otra célula presente en el tejido, probablemente los mastocitos, podría servir como fuente de infección para las garrapatas (Ojogun y col., 2011). En primer lugar se infectan las células intestinales,

con una tasa de infección del 85 al 87%, cuando se alimenta de un hospedador infectado. Posteriormente, se desarrolla rápidamente una infección generalizada en otros tejidos, como las glándulas salivales, con una tasa de infección del 100% (Kocan y col., 2012).

A partir del segundo día de alimentación de las garrapatas en el hospedador vertebrado se produce una respuesta inflamatoria dérmica en la que los granulocitos, principalmente neutrófilos y eosinófilos, se ven atraídos al sitio de alimentación mediante un proceso de quimiotaxis, para ser infectados por *A. phagocytophilum*. La degranulación de los neutrófilos en el sitio de la picadura de las garrapatas aumenta la permeabilidad de los vasos sanguíneos y la infiltración celular, encontrándose organismos en la parte media y periférica de las paredes de los vasos y del endotelio. Entre cuatro y siete días después de entrar en la dermis, se desarrolla la bacteriemia, durante la cual los organismos pueden llegar a infectar a más del 50% de los granulocitos en los bóvidos en su fase de pico (Tuomi, 1967, Carlyon y Fikrig, 2003, Herron y col., 2005, Granquist, Aleksandersen y col., 2010, Reppert y col., 2014). La adhesión e invasión celular de *A. phagocytophilum* son procesos complejos que implican interacciones entre estructuras asociadas a la membrana del hospedador (Kocan y col., 2015). Una vez dentro de los granulocitos infectados, principalmente los neutrófilos maduros, las bacterias están presentes formando colonias dentro de vacuolas intracitoplásmicas llamadas mórulas que miden de 1,5 a 2,5  $\mu\text{m}$  de diámetro, pero pueden llegar hasta los 6  $\mu\text{m}$ , donde se replican por fisión binaria a partir de partículas individuales discretas, como describieron Woldehiwet y Scott (1982). Los organismos de *A. phagocytophilum* se liberan para iniciar nuevas infecciones que se producen a las 36 horas de su ingreso en la célula hospedadora (Woldehiwet y Scott, 1982, Rikihisa, 1991, Chen y col., 1994, Popov y col., 1998, Troese y Carlyon, 2009, Rikihisa, 2011).

Los leucocitos más comúnmente infectados son los neutrófilos, seguidos de eosinófilos y monocitos. Los neutrófilos se infectan predominantemente durante la fase aguda de la enfermedad, mientras que los monocitos se infectan hacia el final (Pusterla, Huder y col., 1997).

Dentro de la célula hospedadora, *A. phagocytophilum* tiene que evitar los mecanismos inmunitarios defensivos normales del neutrófilo mediante el bloqueo de la fusión de los lisosomas con el fagosoma protector en el que reside la bacteria, que construye a través de la alteración de una vía endocítica de la célula hospedadora, algo que hace única a esta bacteria, con características de endosoma que además retiene las

moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) de clase I y II. La supervivencia intraneutrófila de *A. phagocytophilum* también indica que utiliza mecanismos para inhibir la producción de especies reactivas de oxígeno derivados del anión superóxido así como la actividad de NADPH oxidasa. Además, se describe una reducción de la capacidad fagocítica y la diapédesis de los neutrófilos infectados en las células del hospedador. Todos estos mecanismos de evasión inmunitaria de *A. phagocytophilum* se traducen en una mayor susceptibilidad a las infecciones oportunistas para el hospedador vertebrado (Webster y col., 1998, Gokce y col., 1999, Wang y col., 2002, Carlyon y Fikrig, 2003, Woldehiwet, 2008, Rikihisa, 2011).

Además, en un nuevo intento de la bacteria para sobrevivir, se observa una variación antigénica influenciada por la respuesta inmunitaria del hospedador. Mediante mecanismos combinatorios, *A. phagocytophilum* genera diversidad antigénica en la proteína MSP2/P44 para aumentar la persistencia y el mantenimiento del organismo en las células hospedadoras, al generar nuevos antígenos (Barbet y col., 2003).

Los neutrófilos tienen una vida media corta de seis a 12 horas, por lo que *A. phagocytophilum* tiene que aumentar la vida de su célula hospedadora para poder replicarse con éxito y lo hace retrasando la apoptosis de los neutrófilos mediante diferentes mecanismos (Carlyon y Fikrig, 2003, Granquist, Stuen y col., 2010, Rikihisa y col., 2010, Rikihisa, 2011, de la Fuente, Estrada-Pena y col., 2016). Además, estimula la producción de IL-8, que permite reclutar más células diana hospedadoras.

Los patógenos son capaces de evitar la respuesta inmunitaria para favorecer la infección y la multiplicación, y, en este sentido, *A. phagocytophilum* ha demostrado un efecto sobre la inhibición de la respuesta inmunitaria innata, causando inmunosupresión tanto al afectar una gran cantidad de granulocitos y linfocitos en la sangre periférica como al afectar algunas de sus funciones, tal y como se ha mencionado previamente. En los neutrófilos, los genes relacionados con el sistema inmunitario que codifican interferones, citocinas, quimiocinas y sus receptores, se regulan positivamente en respuesta a la infección por *A. phagocytophilum*, lo que ayuda a controlar la infección, pero también puede contribuir a la patogenia de la enfermedad. Se ha sugerido que la patogénesis de la anaplasmosis no es causada directamente por el organismo, sino que la lesión puede ser en parte mediada por el hospedador, siendo el resultado de una estimulación aberrante mediada por citocinas de los histiocitos. Asimismo, la inmunosupresión típica de esta infección se caracteriza por leucopenia grave debido a linfocitopenia temprana, neutropenia prolongada y trombocitopenia,

como se verá posteriormente (Lepidi y col., 2000, Carlyon y Fikrig, 2003, de la Fuente, Ayoubi y col., 2005, Lee y col., 2008, de la Fuente, Estrada-Pena y col., 2016, Stuenkel 2016). Estudios llevados a cabo en ovejas con infección por *A. phagocytophilum* muestran que, además de las defensas innatas dañadas, la función de los linfocitos también puede verse afectada durante la infección. Específicamente, hay una reducción en el número de células T CD4 y cambios en la relación de células T CD4: CD8. También se observa una disminución de la expresión CD25 en células T CD4 durante la infección y hasta cinco semanas después de la infección (Woldehiwet, 1991, Whist y col., 2003).

La resolución de la infección por *A. phagocytophilum* se asocia con respuestas inmunitarias celulares que dan como resultado la producción de niveles séricos elevados de interferón gamma (IFN- $\gamma$ ). Se requiere la producción de IFN- $\gamma$  por parte de los linfocitos T cooperadores para promover la activación de fagocitos y la producción de anticuerpos IgG por parte de los linfocitos B (Akkoyunlu y Fikrig, 2000, Dumler y col., 2000, Brown y Barbet, 2016). Se ha observado que los animales previamente expuestos a *A. phagocytophilum* pueden reaccionar a la reinfección, incluso poco después de la infección primaria, permaneciendo inmunes o, en algunos casos, desarrollando bacteriemia y reacciones febriles, pero de menor duración y magnitud que las observadas en animales no expuestos previamente. Los estudios experimentales en modelo ovino han demostrado que la inmunidad después de una infección primaria por *A. phagocytophilum* varía, de forma que los hospedadores pueden resistir la exposición homóloga durante un período de unos meses a más de un año, ya que el grado de protección está influenciado por la cepa, la edad y el tipo de hospedador, el período de tiempo entre la infección primaria y la reinfección y la frecuencia de la exposición a la infección (Tuomi, 1967, Woldehiwet, 2010a, Thomas y col., 2012, Stuenkel, 2016).

#### ○ Signos clínicos y lesiones

Los signos clínicos suelen aparecer unos días después de que el ganado sea trasladado por primera vez a los pastos, ya que los animales que han pastado durante más de un período de pastoreo no suelen mostrar signos o éstos son muy leves. En este sentido, se considera que, aunque la inmunidad adquirida en la temporada anterior de pastoreo podría ser insuficiente para prevenir la infección, sí es suficiente para prevenir los signos clínicos. Sin embargo, estos signos no se observan en los terneros, aunque se encuentren en los pastos por primera vez, y el ganado joven presenta un curso más leve que el ganado de más edad, siempre que no se produzca una infección secundaria. Los signos clínicos típicos se caracterizan por fiebre, depresión y anorexia,

que da lugar a debilidad en los animales, abortos y, aunque rara vez es mortal, ocasionalmente puede ser fatal cuando se complica con otras infecciones (Foggie, 1951, Tuomi, 1967, Juste y col., 1989, Pusterla y col., 1997, Pusterla y col., 1998, Stuen, Bergström y col., 2003, Stuen, 2007, Laloy y col., 2009, Silaghi y col., 2018). Así, la gravedad de la infección está influenciada por varios factores, como las variantes de *A. phagocytophilum* implicadas, las coinfecciones por otros patógenos, la edad, el estado inmunitario, la condición del hospedador y otros factores, como el clima y el manejo (Stuen, 2007, Stuen, Bergström y col., 2003).

El período de bacteriemia se acompaña de fiebre, con temperaturas que, en ocasiones, son superiores a 41°C. Esta fiebre generalmente dura alrededor de siete a diez días, aunque puede llegar a durar hasta dos semanas, alcanzando su punto máximo durante el segundo día de bacteriemia. Se ha descrito que puede darse una posible recaída de dos a cuatro semanas después de la primera reacción febril, aunque en un estudio en ovejas se observó que los ciclos secundarios y posteriores de bacteriemia no se acompañaron de respuestas febriles u otras características clínicas (Foggie, 1951, Tuomi, 1967, Pusterla y Braun, 1997, Woldehiwet, 2010b, Thomas y col., 2012).

Durante la fase febril se puede observar una disminución repentina y drástica en la producción de leche de hasta de un 75%, signo clínico común y prominente en el ganado lechero. Esta producción se recupera tras dos semanas, alcanzando de nuevo los niveles previos a la infección. También puede desarrollarse mastitis, habitualmente en vacas secas, donde se han identificado agentes como *Streptococcus agalactiae* y *Staphylococcus aureus*, probablemente resultado de la inmunosupresión (Juste y col., 1989, Pusterla y Braun, 1997, Woldehiwet, 2006, Guyot y col., 2011).

La presencia de abortos se da principalmente en vacas al final de la gestación expuestas a la infección por primera vez, dos o tres días después del inicio de la enfermedad (Juste y col., 1989), pudiendo ser una consecuencia de la pirexia, si bien el mecanismo patogénico no está claro (Pusterla y col., 1997). Sin embargo, los abortos no son observados siempre (Pusterla y Braun, 1997, Silaghi y col., 2018). Esto puede deberse al desarrollo de otras infecciones bacterianas secundarias, por el efecto inmunosupresor de *A. phagocytophilum*, dando como resultado un aborto posterior, o que *A. phagocytophilum* por sí mismo sea el causante del aborto (García-Pérez y col., 2003). En este sentido Tuomi (1967) propuso que había diferencias entre cepas, al encontrar que las cepas finesas no causaban aborto a diferencia de las escocesas descritas previamente por otros autores (Wilson y col., 1964). En esta línea, un estudio realizado recientemente en Francia trató de identificar un marcador genético para

diferenciar cepas de *A. phagocytophilum* que producen aborto de las que no lo causan, encontrando un alelo de triple repetición estadísticamente más frecuente en las cepas de *A. phagocytophilum* presente en el ganado que había abortado (Dugat, Haciane y col., 2017).

También se ha descrito la alteración en la espermatogénesis en ovinos y bovinos, con una reducción de la fertilidad (Stuen y col., 2013).

Otra consecuencia de la pirexia podría ser la polipnea, si bien se han registrado otros signos respiratorios, como secreción nasal, disnea, tos y sonidos pulmonares anormales (Juste y col., 1986, Woldehiwet, 2006, Woldehiwet, 2010b, Silaghi y col., 2018). Como signos anecdóticos durante la fase aguda de la infección, se ha descrito edema de las extremidades inferiores con marcha rígida en el ganado y pérdidas de producción en terneros y corderos (Stuen y col., 2002, Guyot y col., 2011, Nieder y col., 2012, Stuen y col., 2013, Silaghi y col., 2018). Aunque se han registrado pérdidas de peso de entre 1,34 a 3,8 kg en corderos con *A. phagocytophilum*, un menor incremento de peso puede deberse a otros factores, como el efecto de la edad en el momento del registro de peso, la edad de la madre, el sexo, el manejo y la producción de la madre, explicando mucho más la variación en el aumento de peso y, por tanto, por lo general se indica que la infección con *A. phagocytophilum* no afecta al peso sustancialmente (Grøva y col., 2011, Grøva y col., 2013).

*A. phagocytophilum* además causa efectos inmunosupresores, por la leucopenia grave que produce, que suele durar de ocho a 17 días (Pusterla, Huder y col., 1997). Por tanto, los animales son más susceptibles a infecciones secundarias, lo que resulta en un aumento de la incidencia de las mismas. En concreto, se ha descrito en pequeños rumiantes que hasta un 30% de los corderos desarrollan como infección secundaria más común la causada por *Staphylococcus aureus* y se considera la complicación más grave en ovejas, habiéndose descrito también en esta especie la pasteurelosis y la listeriosis septicémica (Øverås y col., 1993, Woldehiwet, 2006, Woldehiwet, 2010b, Atif, 2015, Dugat y col., 2015).

En un estudio de Hudson (1950) con animales inoculados con *A. phagocytophilum* se sacrificaron dos bovinos para investigar los cambios patológicos ocasionados y se describió el desarrollo de cambios inespecíficos en los órganos. Concretamente observaron la existencia de una ligera inflamación del bazo debido a la dilatación de los corpúsculos de Malpighi, sin lesiones macroscópicas, y tanto a nivel esplénico como de los nódulos linfáticos, se observaba una disminución del número de



linfocitos presentes, con la presencia de fluido edematoso en la pulpa esplénica y en los senos de los nódulos. En el hígado las células de Kupffer aparecieron más prominentes de lo normal. Los riñones presentaban ligera inflamación en túbulos, presencia de material hialino en la cápsula de Bowman y congestión medular. Posteriormente se ha descrito como hallazgo de la necropsia en el ovino que las lesiones macroscópicas más comunes son la inflamación sistémica y la hiperplasia de tejidos linfoides, incluida la esplenomegalia hasta de cuatro a cinco veces el tamaño normal, con una disminución de su consistencia y, a menudo, con hemorragias subcapsulares (Foggie, 1951, Reppert y col., 2014).

- Hallazgos laboratoriales

En general, los hallazgos hematológicos son similares tanto en casos de infección natural como experimental. Uno de los principales efectos de la infección con *A. phagocytophilum* es la leucopenia grave, aunque también se ha registrado leucocitosis en animales con ruidos pulmonares anormales (Juste y col., 1989). Los primeros cambios que se producen son una disminución en el hematocrito, el recuento de eritrocitos y la concentración de hemoglobina (Purnell y col., 1977, Pusterla, Huder y col., 1997). Estos cambios suelen ser transitorios, siendo el resultado de una mayor tasa de destrucción o una eritropoyesis alterada (Pusterla, Huder y col., 1997). La leucopenia grave se caracteriza por linfopenia inicial, seguida de neutropenia y, en algunos casos, eosinopenia. Si bien el número de linfocitos comienza a aumentar unos pocos días después de la fase aguda, el número de neutrófilos, y de eosinófilos en los casos de eosinopenia, continua disminuyendo y no vuelven a los valores normales hasta el final de la infección (Hudson, 1950, Tuomi, 1967, Purnell y col., 1977). La leucopenia se ha atribuido a la posible supresión de la producción de médula ósea o a la destrucción de las células infectadas (Hudson, 1950, Pusterla, Huder y col., 1997). El número de monocitos no suele sufrir variaciones, sin embargo, se ha descrito una disminución leve y de corta duración (Pusterla, Huder y col., 1997, Silaghi y col., 2018). Otro hallazgo de laboratorio típico es la trombocitopenia, que puede llegar a ser grave. Esta disminución puede ser debida a un mayor consumo de plaquetas, ya que en procesos inmunológicos e inflamatorios juegan un papel importante, y a la destrucción prematura en el bazo (Pusterla, Huder y col., 1997). El número de trombocitos suele volver a la normalidad antes del día 21 post infección (Pusterla, Huder y col., 1997, Silaghi y col., 2018).

Por lo general, no se observan cambios en las concentraciones de proteínas plasmáticas y fibrinógeno (Pusterla y col., 1997, Pusterla, Huder y col., 1997).



Las concentraciones de creatinina y bilirrubina pueden aumentar lentamente al comienzo de la infección, volviendo a la normalidad sin signos laboratoriales de insuficiencia renal o hepática (Pusterla, Huder y col., 1997, Silaghi y col., 2018). Otros hallazgos bioquímicos en ganado vacuno infectado naturalmente han sido una disminución estadísticamente significativa en albúmina, gamma glutamil transpeptidasa (GGT), glutamato deshidrogenasa (GLDH), magnesio y calcio, si bien los propios autores que describieron estos cambios analizan estos resultados con cautela, debido al bajo número de animales incluidos, diez novillas (Silaghi y col., 2018).

- Diagnóstico

El diagnóstico clínico podría basarse en la aparición repentina de fiebre muy alta asociada a cambios hematológicos, unido a características epidemiológicas que puedan hacer sospechar de la infección por *A. phagocytophilum*, si bien se hace necesario confirmar el diagnóstico con métodos directos o indirectos.

El diagnóstico directo, que permite poner en evidencia la presencia del agente en el bovino, puede realizarse mediante la observación directa de las inclusiones intracelulares teñidas de azul oscuro a púrpura con tinción Romanowsky, Giemsa o Diff-Quik de animales infectados durante la fase aguda de la enfermedad. Las mórulas de *A. phagocytophilum* aparecen como inclusiones redondas, a menudo punteadas, en granulocitos, especialmente neutrófilos, y se tiñen más oscuro que el núcleo de la célula hospedadora (Chen y col., 1994, Rikihisa, 2011). En los primeros estudios de infección, se señalaba que en los frotis de sangre de ovejas infectadas se podían observar cuerpos de inclusión en los neutrófilos, eosinófilos, basófilos y monocitos, mientras que en frotis de ganado vacuno, en general, estaban presentes en el citoplasma de granulocitos neutrófilos y eosinófilos, y la presencia de las mórulas en el citoplasma de monocitos eran una rareza que se encontraba cuando las mórulas ya habían desaparecido de los granulocitos (Foggie, 1951, Tuomi, 1967). En estudios posteriores sobre patología comparativa de anaplasmosis granulocítica en humanos, caballos y rumiantes y su distribución en los tejidos se determinó que más del 95% de las células infectadas eran neutrófilos maduros y rara vez se encontraron otras células diferenciadas infectadas en pacientes y animales con cargas bacterianas elevadas, incluidos los fibroblastos, las células endoteliales y los fagocitos mononucleares. Sin embargo, se identificó un pequeño número de células mononucleares que contenían el agente en médula ósea y bazo, y aunque estas células puedan ser fagocitos mononucleares, también es posible que representen etapas progenitoras de diferenciación de células hematopoyéticas a

partir de las cuales se propaga la infección por *A. phagocytophilum* (Lepidi y col., 2000). Otros autores han comentado que los monocitos se infectan al final de la bacteriemia primaria y han encontrado monocitos infectados en la zona dérmica de entrada (Pusterla, Huder y col., 1997, Woldehiwet, 2008, Granquist, Aleksandersen y col., 2010).

A pesar de que sea posible observar estas inclusiones en el interior de las células infectadas, es importante tener en cuenta que se requiere un observador con experiencia para llevar a cabo este diagnóstico directo, y, además, no es fiable para detectar animales sin signos clínicos o portadores, ya que las mórulas aparecen de cinco a ocho días después de la infección y se observan hasta 11 ó 19 días después de la infección, como se ha revelado en infecciones experimentales de ganado con *A. phagocytophilum* (Pusterla y Braun, 1997). De media, los cuerpos de inclusión se pueden ver un día antes de la aparición de los signos clínicos y hasta ocho días después de la pirexia (Tuomi, 1967, Pusterla y Braun, 1997, Pusterla, Huder y col., 1997).

Por otra parte, se dispone de varias técnicas de PCR, convencionales, anidadas y en tiempo real, que no solo se usan para la identificación de la infección por *A. phagocytophilum*, sino también para la caracterización genética de diferentes variantes, utilizando los genes diana ya comentados previamente: 16S ARNr, *groEL*, *ankA*, *msp2/p44* y *msp4* (Dugat y col., 2015, Battilani y col., 2017). Massung y colaboradores publicaron un artículo en 2003 en el que evaluaron y compararon varias PCRs, describiendo que la PCR convencional que amplifica el gen *msp2* muestra un límite de detección comparable al de una PCR anidada, cuyo límite de detección es de dos copias de ADN genómico, y, además de una excelente sensibilidad, también fue la PCR más específica de especie probada (Massung y Slater, 2003). Por lo general se considera que la PCR es útil para el diagnóstico en general y particularmente durante las etapas tempranas y tardías, identificándose ADN del agente por PCR en muestras de sangre de uno a dos días antes y hasta dos a 12 días después del último día de poderse detectar el agente por microscopía. Esta técnica puede emplearse igualmente con muestras de tejido (Pusterla, Huder y col., 1997, Stuen, 2016).

Finalmente, entre los métodos de diagnóstico directo debe mencionarse el cultivo de *A. phagocytophilum* en la línea celular HL60, así como las líneas celulares ISE6 e IDE8 del vector norteamericano, *Ixodes scapularis*, si bien se trata de un método relegado a labores de investigación, debido a la dificultad del cultivo de este agente y a los largos períodos de tiempo necesarios para la confirmación del crecimiento de la rickettsia (o ausencia del mismo) (Rikihisa, 1991). No obstante, se trata de un método

que puede ser útil para comprender mejor la epidemiología, la genética, la patogenia y el tratamiento (Goodman y col., 1996, Munderloh y col., 2004).

En la evaluación de respuestas serológicas para llevar a cabo el diagnóstico indirecto se han utilizado la fijación del complemento, la inmunoelectroforesis a contracorriente, la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (o ELISA, acrónimo del inglés *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*). Incluso está disponible comercialmente un ELISA para la identificación rápida de anticuerpos de *A. phagocytophilum* en suero de perro, que también se ha utilizado con éxito en sueros de caballo y oveja (Woldehiwet, 2006, Granquist, Stuen y col., 2010, Hansen y col., 2010, Stuen y col., 2013). De entre estas pruebas es la IFI, que utiliza *A. phagocytophilum* cultivado *in vitro* como antígeno, la usada más frecuentemente. Diferentes estudios han demostrado que la seroconversión ocurre de seis a 11 días después de la infección, tanto en condiciones naturales como experimentales, persistiendo los títulos positivos durante 120 a 180 días, y siendo la duración media de 120 días después de una única infección natural (Pusterla, Huder y col., 1997, Pusterla y col., 1998, Lepidi y col., 2000). Los métodos serológicos se usan con mayor frecuencia que los directos para el diagnóstico clínico, pero estos ensayos a menudo son negativos en las primeras etapas de una infección aguda, ya que los anticuerpos generalmente estarán ausentes durante la primera semana de infección (Dumler y col., 1995, Massung y Slater, 2003, Laloy y col., 2009, Stuen, 2016).

#### ○ Tratamiento

Normalmente en el caso de presentarse un brote, las tetraciclinas son el tratamiento de elección, resultando en una resolución rápida de la fiebre (Venn y Woodford, 1956). Si bien se ha descrito que la infección por *A. phagocytophilum* puede resolverse sin tratamiento con antibióticos en ganado bovino, que puede recuperarse de la enfermedad después de una media de ocho días (Pusterla y Braun, 1997). Dentro de este grupo, la oxitetraciclina y las tetraciclinas semisintéticas, concretamente la doxiciclina, son en la actualidad los fármacos más utilizados en el tratamiento de *A. phagocytophilum*. Se ha estudiado experimentalmente el efecto del uso de las oxitetraciclinas, comparando las de corta duración, con una posología de 10 mg/kg de peso corporal por vía intravenosa durante cinco días, y las de acción prolongada, con una sola inyección intramuscular a una dosis de 20 mg/kg de peso corporal, no encontrando diferencias entre estos dos regímenes de tratamiento en corderos infectados (Stuen y Bergstrom, 2001). Sin embargo, a pesar de que una dosis de oxitetraciclina de acción corta administrada en la etapa aguda de la infección resulta

eficaz frente a la fiebre, estos tratamientos no fueron suficientes para eliminar el agente en estos corderos infectados experimentalmente con *A. phagocytophilum*, incluso un mes después del tratamiento (Brodie, 1985, Stuen, 2016).

*A. phagocytophilum* también es susceptible a la rifampicina y las fluoroquinolonas siendo fármacos alternativos para animales con intolerancia a las tetraciclinas (Woldehiwet, 2010a, Stuen, 2016).

- Control y prevención

Las estrategias actuales de prevención de la anaplasmosis granulocítica causada por *A. phagocytophilum* en animales domésticos se basan en la reducción de infestaciones por garrapatas. Para ello, se recomienda la aplicación de acaricidas, como piretroides o lactonas macrocíclicas, tratamiento que debe repetirse durante la temporada de garrapatas. Sin embargo, esta medida de control y prevención preocupa por el aumento del coste de los tratamientos antiparasitarios, la contaminación ambiental, así como por la resistencia cada vez mayor de las garrapatas. Además, esto a menudo no es factible en áreas endémicas, por lo que es necesario conocer el estado de prevalencia del agente en el rebaño para establecer estrategias de control y prevención adecuadas. En el caso de rebaños libres, hay que mantener este estado evitando el contacto con el agente, al evitar la infestación del ganado con garrapatas. En áreas donde el ganado persistentemente infectado es común y contribuye a la estabilidad endémica, puede ser importante mantener esta situación, evitando introducir ganado susceptible y favoreciendo el contacto temprano con el agente, con lo que se consigue que los animales presenten un curso más moderado y obtengan cierta inmunidad. También, hay que tener en cuenta el control de la importación y de los movimientos de animales entre zonas, el testaje y la eliminación de animales portadores en zonas no endémicas (Kocan y col., 2000, Stuen, Nevland y col., 2003, Potgieter y Stoltz, 2004, Woldehiwet, 2010b, Nieder y col., 2012, Contreras y col., 2015, Kocan y col., 2015).

Por otra parte, el control biológico de garrapatas se está convirtiendo en un enfoque atractivo para el manejo de las enfermedades transmitidas por ellas. Hasta ahora, los estudios se han centrado en el empleo de bacterias patógenas para las garrapatas, así como en hongos y nematodos patógenos, para alcanzar un control biológico sostenible de las garrapatas en el hábitat natural (Samish y col., 2004). El desarrollo de vacunas contra la infestación por garrapatas también es una opción alternativa. Estas vacunas controlan las infestaciones por garrapatas a través de la inmunización del hospedador con antígenos de garrapatas seleccionados (de la Fuente

y Kocan, 2006). Estas vacunas y el control biológico ofrecen la ventaja de ser respetuosos con el medio ambiente en comparación con el control mediante acaricidas.

Las vacunas contra *A. phagocytophilum* aún no están disponibles, a pesar de que se han sugerido varios antígenos vacunales candidatos que podrían combinarse entre sí. En el desarrollo de estas vacunas se busca seleccionar aquellos antígenos que se conservan entre todas las variantes, como los derivados del gen *p44* o las proteínas MSP4 y HSP70, involucrados en las interacciones hospedador-patógeno (Ijdo y col., 1998, Contreras y col., 2017).

La oxitetraciclina de acción prolongada también se ha usado como medida profiláctica administrada antes de que los animales pasen de un entorno libre de garrapatas a un pasto infestado de garrapatas. Sin embargo, existe una creciente preocupación sobre la seguridad ambiental y la salud humana por el uso indiscriminado de antibióticos como método de prevención (Brodie, 1985, Stuenkel y Bergstrom, 2001, Guyot y col., 2011, Stuenkel, 2016).

- Consideraciones de salud pública

Como hemos tratado anteriormente, *A. phagocytophilum* puede afectar al ser humano, si bien no todas las variantes de este agente son causantes de la HGA y, además, existen diferencias en la epidemiología en América del Norte y Europa. En 2016, los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de Estados Unidos (CDC) registraron 4.151 casos de esta enfermedad, mientras que su homólogo europeo, el Centro Europeo para el Control y la Prevención de Enfermedades, muestra que los casos no son frecuentes ni mortales, teniendo un curso menos grave que podría pasar desapercibido. En una revisión de la Sociedad Europea de Microbiología Clínica y Enfermedades Infecciosas se describió que entre los años 1997 a 2013 se habían confirmado, según los estándares de esta sociedad, 58 casos. Este menor número de casos en Europa podría deberse a que pasa desapercibida y no se diagnostica por sus síntomas inespecíficos, posiblemente menos graves que los de Estados Unidos (Dugat y col., 2015). No obstante, en un reciente estudio en el que se analizaban las secuencias *msh2/p44* de cepas de origen humano disponibles de todo el mundo, se concluyó que las cepas que infectan a los humanos son un subconjunto con una estructura del genoma más conservada y similar que las propias de animales domésticos o silvestres (Barbet y col., 2013).

El primer caso publicado de HGA fue descrito por Chen y colaboradores en 1994, describiendo la presencia de unas vacuolas granulocíticas semejantes a mórulas en una serie de pacientes con fiebre aguda en Minnesota y Wisconsin entre 1990 y 1993 en Estados Unidos, confirmándose molecularmente que se trataba de una especie virtualmente idéntica a las entonces conocidas como *E. phagocytophila* y *E. equi* (Chen y col., 1994). En Europa el primer caso de HGA se confirmó serológicamente y molecularmente en Eslovenia (1996) durante un estudio prospectivo sobre la etiología de las enfermedades que cursaban con fiebre dentro de las seis semanas posteriores a la picadura de una garrapata, concretamente detectándose en una mujer de 70 años (Petrovec y col., 1997). No obstante, un estudio previo realizado en Suiza (Brouqui y col., 1995) halló una seroprevalencia del 17,1% en los sueros de pacientes que habían sido picados por garrapatas y, desde entonces, se han descrito más casos, particularmente en Centro Europa (Blanco y Oteo, 2002). En España, en La Rioja en 1999, el primer caso serológicamente confirmado fue un hombre de 16 años, al que le había picado una garrapata 15 días antes, con síntomas de malestar, mialgias, dolor de cabeza y fiebre (Oteo y col., 2000). Posteriormente, en un estudio realizado en La Rioja con 147 muestras se halló una seroprevalencia del 1,4%, demostrando la presencia de la HGA (Oteo y col., 2001).

Comúnmente, los pacientes presentan síntomas inespecíficos y variables similares a la gripe, con fiebre, dolor de cabeza, mialgias y malestar general y también se han descrito síntomas neurológicos, como confusión, que comienzan de una a dos semanas después de la picadura de una garrapata infectada. Aunque generalmente son autolimitantes y se considera que más del 60% de los pacientes solo presentan síntomas moderados, pueden producirse complicaciones graves que incluyen fiebre prolongada, convulsiones, neumonía, insuficiencia renal aguda, hemorragias, rabdomiolisis, shock e, incluso, llegar a la muerte cuando se asocia con infecciones oportunistas debidas a la inmunosupresión o a una enfermedad subyacente. No obstante, según el CDC la tasa de letalidad es baja, inferior al 1% (Chen y col., 1994, Blanco y Oteo, 2002, Carlyon y Fikrig, 2003, Bakken y Dumler, 2006).

Las anormalidades hematológicas descritas en el hombre incluyen leucopenia y trombocitopenia, ambas presentes en muchos pacientes en el momento de la presentación, que se normalizan al final de la segunda semana. Asimismo se ha descrito un aumento en la actividad de las enzimas hepáticas séricas, la aspartato aminotransferasa (AST) y la alanina aminotransferasa (ALT), que sugiere una lesión hepática de leve a moderada (Chen y col., 1994, Bakken y Dumler, 2006, Dumler y col., 2007). La forma de transmisión más habitual es a través de la picadura de una

garrapata infectada, pero también puede darse la transmisión nosocomial a través de transfusión de sangre, ya que *A. phagocytophilum* es viable a 4°C hasta 18 días en sangre humana infectada (Kalantarpour y col., 2000, Rikihisa, 2011).

El fármaco de elección empleado habitualmente en el tratamiento de la HGA es la doxiciclina, administrada por vía oral o intravenosa, debido a su buena tolerancia por el paciente y a sus propiedades farmacocinéticas favorables, en comparación con otros derivados de la tetraciclina, con una respuesta rápida. La mejoría clínica suele ser evidente a las 24-48 h y tras siete a diez días de tratamiento las infecciones se han resuelto por completo sin recidivas. Normalmente, los pacientes que reciben tratamiento temprano se recuperan rápidamente, mientras que aquellos que experimentan un curso más grave pueden necesitar antibióticos por vía intravenosa, hospitalización prolongada o cuidados intensivos. Debido a la posibilidad de infección grave o, incluso, mortal, se recomienda que todos los pacientes con sospecha de anaplasmosis granulocítica se traten con doxiciclina, incluso en ausencia de picadura de garrapata conocida, un examen negativo de un frotis de sangre o resultados pendientes de pruebas de diagnóstico específicas de *A. phagocytophilum*. Las rifamicinas también tienen una excelente actividad, usándose como alternativa a la doxiciclina (Bakken y Dumler, 2006, Dumler y col., 2007, Bakken y Dumler, 2015, Centers for Disease Control and Prevention, 2018).

#### **2.2.1.2. *Anaplasma marginale***

*Anaplasma marginale*, a la que normalmente se hace referencia al hablar de anaplasmosis bovina (aunque bajo esta denominación también se podría incluir la enfermedad que causa *A. bovis* y *A. centrale*), es el patógeno transmitido por garrapatas más prevalente en todo el mundo y con mayor distribución mundial en la especie bovina, siendo endémica en áreas tropicales y subtropicales. Esta distribución cada vez es mayor debido al calentamiento global y al transporte de ganado asintomático persistentemente infectado. En Estados Unidos, a excepción del estado de Hawai que se considera libre de anaplasmosis bovina, la enfermedad se ha diagnosticado en casi todos los estados. La anaplasmosis bovina también es endémica en México, América Central y del Sur, así como en las islas del Caribe, con la excepción de las áreas desérticas y ciertas cadenas montañosas, como los Andes. En Europa, *A. marginale* se encuentra principalmente en los países mediterráneos y también se consideran endémicas regiones de Asia, África y Australia (Guglielmone, 1995, Kocan y col., 2003, Rymaszewska y Grenda, 2008).



Causa considerables pérdidas económicas a la industria ganadera, tanto de leche como de carne, principalmente por la reducción en el aumento de peso, la disminución en la producción de leche, aborto, el coste de los tratamientos y la mortalidad (Kocan y col., 2015). Estas pérdidas no se han cuantificado en Europa, a diferencia de lo publicado en otras partes del mundo (Hofmann-Lehmann y col., 2004). En concreto, en Estados Unidos se ha estimado una pérdida de 400 dólares por caso clínico y de 300 millones de dólares por año en la industria ganadera, mientras que en América Latina estas pérdidas pueden ser de 800 millones de dólares (Kocan y de la Fuente, 2003, Coetzee y col., 2005). En Canadá, donde la anaplasmosis es una enfermedad de declaración obligatoria, se estima que las pérdidas directas de producción estuvieron entre 12 y 36 millones de dólares en 2003, con un coste para evitar la propagación de la anaplasmosis de tres millones de dólares (Coetzee y col., 2010, Canadian Food Inspection Agency and Government of Canada, 2014).

*Anaplasma marginale* fue descrita como tal por Theiler en 1910 al detectar un punteado en la periferia de los eritrocitos del ganado sudafricano. Sin embargo, fueron Smith y Kilborne (1893) en su publicación sobre las garrapatas como vectores de la fiebre del ganado de Texas quienes describieron por primera vez la presencia de un patógeno en los frotis de sangre del ganado como un cuerpo redondeado diminuto que se teñía de azul situado cerca del borde del eritrocito, concluyendo erróneamente que estos cuerpos formaban parte del ciclo de vida de *Babesia bigemina*. Theiler discutió la opinión general de que los puntos marginales o puntos periféricos formaran parte del ciclo vital de *B. bigemina* y determinó correctamente que la babesiosis y la anaplasmosis eran enfermedades diferentes que a menudo coexistían en el mismo animal y logró separar los dos agentes, al producir infecciones puras con *A. marginale*. Por tanto, gracias a las publicaciones de Theiler sobre anaplasmosis en 1910-1911, quedó claro que algunos de los animales con los que Smith y Kilborne habían trabajado estaban infectados con babesia y anaplasma (Smith y Kilborne, 1893, Theiler, 1910, Theiler, 1911, Alderink y Dietrich, 1983, Dumler y col., 2001, Kocan y col., 2010).

- Bacteriología y epidemiología

*A. marginale* es una bacteria intracelular obligada con un diámetro de 0,2 a 0,5  $\mu\text{m}$  que se encuentra exclusivamente dentro de vacuolas como cuerpos de inclusión de 0,5 a 1  $\mu\text{m}$  en el citoplasma de los eritrocitos del hospedador vertebrado, multiplicándose tanto en vertebrados como en sus garrapatas vectores (Theiler, 1910). *A. marginale* puede crecer en la línea celular IDE8, que se derivó originalmente de embriones de *Ixodes scapularis*, y en una línea de células endoteliales bovinas



(Munderloh y col., 1996, Waghela y col., 1997, Munderloh y col., 2004). Este agente, como *A. phagocytophilum*, carece de genes que codifican las rutas biosintéticas para la producción de lipopolisacáridos y peptidoglucanos (Brayton y col., 2005).

Aunque *A. marginale* infecta solo a los rumiantes, se ha demostrado una gran diversidad, con más de 100 cepas genéticamente distintas identificadas en todo el mundo, hecho que se ha visto favorecido especialmente en áreas de intenso movimiento de ganado. Estas cepas difieren en biología, morfología, secuencias de proteínas, características antigénicas e infectividad para garrapatas, con las que además co-evolucionan, ya que se ha demostrado que los factores ambientales que regulan las poblaciones de garrapatas actúan sobre la selección de diferentes secuencias del gen *msp1 $\alpha$*  de *A. marginale* (Bock y de Vos, 2001, de la Fuente, Van Den Bussche y col., 2001, Kocan, de la Fuente y col., 2004, de la Fuente, Lew y col., 2005, Estrada-Peña y col., 2009). Este gen codifica la proteína MSP1a, adhesina indispensable para la invasión de las células de la garrapata y eritrocitos bovinos y para la transmisión de *A. marginale*, que presenta diferente peso molecular entre aislamientos geográficos, debido a un número variable de repeticiones en tándem, de 23-31 aminoácidos. Esta variación se ha aprovechado para utilizar el gen *msp1 $\alpha$*  como marcador genético para la identificación de aislamientos geográficos de *A. marginale* (Barbet y col., 1987, Palmer y col., 1988, Allred y col., 1990, de la Fuente, Van Den Bussche y col., 2001, de la Fuente, García-García, Blouin y Kocan, 2001, de la Fuente, García-García y col., 2003, de la Fuente, Lew y col., 2005). Sin embargo, se ha descrito que la proteína MSP1a evoluciona rápidamente, estando el gen *msp1 $\alpha$*  bajo presión de selección positiva que depende del clima y las precipitaciones, y, por tanto, no proporciona información filogeográfica adecuada por su alto grado de variación, a no ser que se analicen numerosas secuencias de un área. Por ello, actualmente se tiende a emplear en los análisis filogenéticos no solo el gen *msp1 $\alpha$* , sino también el *msp4*, lo que permite comparar cepas en determinadas regiones (Kocan y col., 2003). Además, se ha descrito el análisis de las repeticiones y microsatélites de MSP1a relacionando las cepas con rasgos ambientales, no geográficos, lo que ha proporcionado información sobre la evolución de las cepas de *A. marginale* determinando su asociación filogeográfica con las regiones ecológicas mundiales o ecorregiones (Estrada-Peña y col., 2009). Con esta aproximación, se ha observado que en las ecorregiones donde la temperatura y precipitaciones son más favorables para las garrapatas, las secuencias repetidas de MSP1a muestran el porcentaje más bajo de aminoácidos conservados y la mayor presión de selección positiva, mientras que en las ecorregiones donde la población de garrapatas sufre limitaciones debido a la baja o inadecuada lluvia, las

secuencias repetidas muestran el mayor porcentaje de aminoácidos conservados y la presión de selección positiva es más baja (Estrada-Pena y col., 2009).

La **transmisión** biológica de *A. marginale* es llevada a cabo por garrapatas, después de que se produce una multiplicación extensa en varios de sus tejidos, resultando ser el medio más eficiente de propagación de este agente, debido a la capacidad que posee de replicación y persistencia dentro de las garrapatas. *A. marginale* es transmitido por especies de garrapatas de los géneros *Dermacentor*, *Rhipicephalus* (*Boophilus*), *Ixodes* y *Hyalomma* (Kocan y col., 2004, Shkap y col., 2009). Por otra parte, a pesar de que las especies del género *Amblyomma* no parecen transmitir *A. marginale*, su ADN ha sido detectado en especies de este género en Etiopía (Teshale y col., 2015). Se han descrito hasta 20 especies de garrapatas implicadas en su transmisión a nivel mundial y en nuestro país se ha identificado *A. marginale* en garrapatas de los géneros *Dermacentor*, *Rhipicephalus* (*Boophilus*) y *Hyalomma*, sugiriéndose que especies de garrapatas no reconocidas previamente como vectores de esta bacteria podrían ser sus vectores en estas regiones (de la Fuente, Naranjo y col., 2004, de la Fuente, Naranjo y col., 2005, Aubry y Geale, 2011).

La transmisión de *A. marginale* en garrapatas se produce de una etapa a otra, transestádica, y dentro de una misma etapa en el caso de los machos adultos de especies de garrapatas de tres hospedadores, intraestádica. La transmisión transovárica no tiene lugar. Las garrapatas machos desarrollan infecciones generalizadas persistentes con *A. marginale*, al menos se ha demostrado en *Dermacentor andersoni* y *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. Se cree que la transmisión intraestádica es un mecanismo importante en la epidemiología de *A. marginale* porque las garrapatas machos pueden infectarse después de un corto periodo de alimentación en un bovino infectado y luego transmitir la infección repetidamente durante la alimentación en animales susceptibles. Las garrapatas machos, por lo tanto, sirven como un reservorio de infección, junto con el ganado, que se mantiene persistentemente infectado (Kocan y col., 1992, Eriks y col., 1993, Aguirre y col., 1994, Kocan, de la Fuente y col., 2004).

Por otra parte, la transmisión mecánica por artrópodos hematófagos de los géneros *Tabanus*, *Stomoxys* y varias especies de mosquitos se considera la principal vía de diseminación de *A. marginale* en los lugares donde las poblaciones de garrapatas son limitadas o inexistentes, siempre que se desarrolle una parasitemia suficiente, o allí donde las cepas de *A. marginale*, como Illinois, Florida y California, no parecen ser infectivas ni transmisibles por garrapatas (de la Fuente, García-García, Blouin, McEwen

y col., 2001, de la Fuente, García-García y col., 2003, Kocan, de la Fuente y col., 2004). Asimismo, se ha descrito la transmisión mecánica de forma iatrogénica a través de material contaminado con sangre de animales infectados, pudiendo también ser una vía de transmisión de gran importancia para *A. marginale* (Kocan y col., 2003, Reinbold y col., 2010a).

La transmisión de la vaca al ternero vía transplacentaria durante la gestación ha sido descrita y se ha demostrado experimental y naturalmente, pudiendo ser importante en algunas zonas. En este sentido, en Sudáfrica se describió una tasa de prevalencia del 15,6% de la transmisión intrauterina de infecciones por *Anaplasma*, contribuyendo a la epidemiología de esta enfermedad (Potgieter y van Rensburg, 1987a, Grau y col., 2013, Aktas y Ozubek, 2017).

La **epidemiología** de la anaplasmosis bovina es compleja y no está bien definida. Se incluye a los rumiantes salvajes en aquellas zonas donde comparten pastos con los rumiantes domésticos. De hecho, se han descrito infecciones en ganado bovino y en varias especies de vida silvestre, aumentando la preocupación por la transmisión de agentes infecciosos entre la vida silvestre y la ganadería doméstica, especialmente en áreas donde comparten tierras de pastoreo. Sin embargo, la susceptibilidad de los rumiantes silvestres a la infección por *A. marginale* y su papel en la epidemiología de la anaplasmosis bovina no son del todo conocidos (Kuttler, 1984, Aubry y Geale, 2011).

Las especies de vida silvestre infectadas persistentemente parecen ser importantes en la epidemiología y propagación de la anaplasmosis porque, como **reservorios** de *A. marginale*, podrían servir como fuente de infección para la propagación mecánica por varias vías y transmisión biológica por garrapatas. En este sentido, se ha descrito que los rumiantes silvestres de Estados Unidos y Canadá como el búfalo de agua (*Bubalus bubalis*), el bisonte americano (*Bison bison*), el ciervo de cola blanca (*Odocoileus virginianus*), el ciervo mulo (*Odocoileus hemionus hemionus*), el ciervo de cola negra (*Odocoileus hemionus columbianus*) y el ciervo de las Montañas Rocosas (*Cervus elaphus nelsoni*), entre otros, pueden infectarse con *A. marginale* y particularmente el ciervo mulo, el ciervo de cola negra y el ciervo común (*Cervus elaphus*), pueden estar implicados en la epidemiología de la anaplasmosis bovina en algunas regiones. Sin embargo, algunos de estos rumiantes podrían infectarse también con *Anaplasma ovis* e incluso, haberse detectado solo *A. ovis* en lugar de *A. marginale*, tal y como se ha sugerido en el caso del ciervo mulo (Kuttler, 1984, Chomel y col., 1994, Keel y col., 1995, Zaugg y col., 1996, Yabsley y col., 2005, de la Fuente y col., 2007, Kocan, de la Fuente, Blouin y col., 2010). También se han caracterizado aislamientos de

*A. marginale* en el bisonte americano naturalmente infectados en Estados Unidos y Canadá, y se demostró la infectividad de este aislado de bisonte de *A. marginale* para el ganado y su transmisión por *Dermacentor variabilis* (de la Fuente, Thomas y col., 2003, Kocan, Golsteyn y col., 2004). En Europa, el ciervo común puede servir como reservorio del patógeno y puede estar implicado en la transmisión de *A. marginale* en las poblaciones de ganado vacuno (de la Fuente, Vicente y col., 2004, de la Fuente, Naranjo y col., 2005, Naranjo y col., 2006, Pereira y col., 2016).

El ganado vacuno que sobrevive a la infección aguda queda persistentemente infectado como portador, con bajos niveles de rickettsemia cíclica, desarrolla una inmunidad sólida y duradera frente a la reinfección y, por tanto, salvo en situaciones de inmunodepresión, no aparecerán signos clínicos en una exposición posterior al agente. Además, este ganado persistentemente infectado sirve como reservorio de *A. marginale* para su transmisión, tanto mecánica como biológica, contribuyendo notablemente a la propagación de la anaplasmosis. Este ganado asintomático pero persistentemente infectado, junto a su transporte, ha contribuido tanto a la propagación de la anaplasmosis como al aumento de la diversidad de las cepas. Si bien muchas especies de animales silvestres son susceptibles a la infección por *A. marginale*, como hemos comentado, los hospedadores reservorios potenciales solo pueden demostrarse definitivamente mediante pruebas de diagnóstico molecular (Kieser y col., 1990, Eriks y col., 1993, French y col., 1998, Kocan y col., 2000, Sevilla y col., 2002).

#### ▪ Situación en España

Según el artículo de Sevilla y colaboradores (2002), en España se describen la mayoría de los casos en el sur de la península, así como en Extremadura, siendo frecuente que acompañe en la infección a otros hemoparásitos transmitidos por ixódidos. Sin embargo, no se encuentra disponible suficiente información sobre su incidencia, prevalencia y distribución en nuestro país (Sevilla y col., 2002, Hurtado y Serrano, 2013).

En 2005 y 2008, de la Fuente y colaboradores realizan estudios de prevalencia y seroprevalencia en animales domésticos y silvestres en Ciudad Real y Cádiz, obteniendo como resultados una prevalencia molecular en ganado vacuno del 20% (21/107) y del 36% (29/81), respectivamente. Además, el 30% en los 20 ciervos (*Cervus elaphus hispanicus*) muestreados en Ciudad Real también presentaron amplificación de ADN de este agente, algo que no ocurrió en los corzos (*Capreolus capreolus*) estudiados en Cádiz. En un artículo donde se hace un estudio en Castilla-La

Mancha y Sicilia se da una prevalencia del 40% (126/217) en ganado vacuno y del 17% (1/6) en ciervos (de la Fuente, Naranjo y col., 2005, Naranjo y col., 2006, de la Fuente y col., 2008).

- Patogenia y respuesta inmunitaria

Al alimentarse las garrapatas de los eritrocitos infectados de los hospedadores vertebrados, los patógenos ingresan primero en el epitelio del intestino medio de la garrapata, donde tiene lugar su replicación primaria. Después del desarrollo de *A. marginale* en las células del intestino, muchos otros tejidos se infectan, incluidas las glándulas salivales, donde invaden las células epiteliales, en las que las bacterias se someten al segundo ciclo de replicación y entran en la secreción de la glándula salivar cuando la garrapata se alimenta del siguiente hospedador vertebrado. En las células de las garrapatas infectadas, *A. marginale* se desarrolla en dos formas, dentro de vacuolas o colonias unidas a la membrana. La primera forma que aparece durante la etapa vegetativa, la forma reticulada, se divide por fisión binaria, formando colonias grandes que pueden contener cientos de organismos. Esta forma reticulada luego cambia a la forma densa, que es la forma infecciosa por la cual se transmite al ganado y puede sobrevivir extracelularmente. La forma densa se transmite a través de las glándulas salivares durante la alimentación de la garrapata en el hospedador vertebrado (Kocan y col., 1992, Ge y col., 1996, Futse y col., 2003, Kocan y col., 2003, Ueti y col., 2009).

Después de la infección inicial y un período de prepatencia que varía dependiendo de la dosis infectiva entre siete y 60 días, con una media de 28 días, *A. marginale* invade los eritrocitos del hospedador vertebrado, donde se replica de forma exponencial durante la infección inicial, llegando a infectar el 70% o más de los eritrocitos durante la infección aguda, con variaciones en función de la cepa de anaplasma y la susceptibilidad del hospedador. En la interacción hospedador-patógeno, la molécula mejor caracterizada es MSP1a, proteína identificada como posible adhesina. Participa en las interacciones entre *A. marginale* y sus hospedadores, el ganado y las garrapatas, ya que se une a los eritrocitos bovinos y a células de las garrapatas, aunque la expresión de MSP1a es diferente, siendo mayor en los eritrocitos. Además, en el caso de la interacción con eritrocitos bovinos encontramos otra adhesina, MSP1b. Sin embargo, los receptores de las células hospedadores que se unen con MSP1a no han sido descritos, aunque el receptor bovino podría estar compuesto tanto por proteínas como por carbohidratos (McGarey y Allred, 1994, McGarey y col., 1994, de la Fuente, García-García, Blouin y Kocan, 2001, de la Fuente, García-García, Blouin, McEwen y col., 2001, de la Fuente, García-García y col., 2003, Kocan y col., 2003,

García-García y col., 2004, de la Fuente, Kocan y col., 2010b, Aubry y Geale, 2011). Los cuerpos iniciales liberados de los eritrocitos parasitados entran en otros eritrocitos por invaginación de su membrana citoplasmática para formar vacuolas que contienen el organismo. Los cuerpos iniciales se someten a una serie de fisiones binarias para formar los cuerpos de inclusión, que se componen de entre cuatro a ocho cuerpos iniciales. Cuando se rompen los eritrocitos se liberan los cuerpos iniciales, que invaden otros eritrocitos (Richey y Palmer, 1990, Potgieter y Stoltz, 2004).

Debido a que las garrapatas no afectan directamente a los vasos sanguíneos, se cree que las células endoteliales microvasculares, que interactúan con las células sanguíneas circulantes *in vivo*, podrían desempeñar un papel en la patogenia de la anaplasmosis bovina, directamente como células hospedadoras e indirectamente como células presentadoras de antígeno, ya que se ha demostrado *in vitro* que el endotelio microvascular es susceptible a la infección por anaplasmas (Munderloh y col., 2004). Este hecho podría explicar el desarrollo de la respuesta inmunitaria y la infección persistente, al proporcionar las células endoteliales un nicho protegido que permitiría que los patógenos persistan en los vertebrados durante períodos prolongados (Munderloh y col., 2004). A pesar de esto, los eritrocitos son el único sitio conocido donde se mantiene la infección de *A. marginale* en el ganado, ya que la propagación de *A. marginale* en las células endoteliales no se ha demostrado *in vivo* (Kocan, de la Fuente, Blouin y col., 2010). Posteriormente los eritrocitos infectados se eliminan del torrente circulatorio mediante fagocitosis por las células del retículo endotelial del bazo, hígado y nódulos linfáticos, induciéndose el desarrollo de una fase de inflamación aguda (Richey y Palmer, 1990).

El ganado que sobrevive a la infección aguda desarrolla infecciones persistentes caracterizadas por rickettsemia cíclica. *A. marginale* se mantiene por debajo de niveles microscópicamente detectables y los signos clínicos están generalmente ausentes, fluctuando entre  $10^3$  y  $10^7$  eritrocitos infectados por mililitro de sangre en intervalos de aproximadamente cinco semanas. También se produce una aparición cíclica de variantes antigénicas como mecanismo de persistencia, ya que así se evade la respuesta inmunitaria del hospedador. Esta variación antigénica se produce a través de la proteína MSP2, y probablemente MSP3, dando como resultado la expresión de un mínimo de tres tipos antigénicos de MSP2 dentro de un ciclo rickettsémico (Kieser y col., 1990, Eriks y col., 1993, French y col., 1998, French y col., 1999, de la Fuente y Kocan, 2001, Brayton y col., 2005). Además de la variación antigénica, para frustrar la respuesta inmunitaria adaptativa, se ha propuesto un nuevo mecanismo de disfunción inmunitaria, que consiste en el agotamiento funcional y eliminación de células T CD4,



debido a altas cargas bacterianas persistentes. Sin embargo, el patógeno solamente suprime la respuesta de células T CD4 específica de *A. marginale* (Han y col., 2010, Brown y Barbet, 2016).

Los mecanismos de control inmunitario de *A. marginale* no se han dilucidado completamente. Se ha propuesto un modelo simple de protección inmunomediada en el que las células presentadoras de antígeno activadas por la infección secretan IL-12 e IFN- $\gamma$  que, a su vez, activan las células T CD4 hacia una vía Th1, secretando IFN- $\gamma$  y amplificando la activación de macrófagos para intensificar la opsonización y destruir a la bacteria o a los eritrocitos infectados. Asimismo, se potencia un cambio de isotipo por las células B hacia una respuesta protectora de IgG2. Este modelo se ha comprobado en terneros inmunizados con una fracción de membrana externa protectora de *A. marginale* compuesta de, al menos, seis polipéptidos de superficie principales, que incluyen las MSPs: MSP1a, MSP1b, MSP2, MSP3, MSP4 y MSP5 (Brown, Shkap y col., 1998, Palmer y col., 1999). Sin embargo, *A. marginale* experimenta continuamente variación antigénica en las proteínas MSP2 y MSP3 durante la infección, así que la IgG2 específica de variante se produce en respuesta a cada variante emergente, lo que sugiere que las respuestas IgG2 controlan nuevas variantes emergentes, pero no eliminan el patógeno, porque continuamente escapan de la respuesta inmunitaria. Además, como se ha comentado, una carga de antígeno alta y continua durante la anaplasmosis aguda y persistente conlleva a una desregulación funcional de los linfocitos T CD4 específicos de *A. marginale* durante la infección, con lo que se imposibilita además la capacidad para establecer una memoria a largo plazo (French y col., 1999, Han y col., 2010).

- Signos clínicos y lesiones

Se considera que *A. marginale* es altamente patógena únicamente para el ganado vacuno. Sin embargo, también parece ser capaz de causar una enfermedad clínica grave en algunas especies silvestres, como la jirafa. En el resto de rumiantes domésticos y silvestres las infecciones dan lugar a una clínica leve o inaparente, pudiendo convertirse en portadores persistentes de *A. marginale*, aunque es poco probable que la mayoría de los rumiantes se infecten en condiciones naturales (Kuttler, 1984, Aubry y Geale, 2011).

La pirexia suele ser el primer signo registrado de anaplasmosis y puede ocurrir antes de la infección del 1% de los eritrocitos, aunque lo habitual es que no se presenten signos hasta que más del 15% de los eritrocitos están parasitados. La fiebre

supera generalmente los 40°C y muestra un carácter transitorio coincidiendo con los picos de bacteriemia. Los eritrocitos infectados son posteriormente fagocitados por las células retículo endoteliales bovinas, lo que da como resultado el desarrollo de anemia hemolítica progresiva cuando se ha eliminado del 40 al 50% de los eritrocitos, que va de leve a grave (Richey y Palmer, 1990, Kocan, de la Fuente, Blouin y col., 2010). Así, los signos más característicos de la anaplasmosis bovina son anemia progresiva e ictericia. Esta anemia se caracteriza por la aparición de palidez de piel y mucosas, aumento de las frecuencias cardíaca y respiratoria y, en las últimas etapas (más comúnmente durante la convalecencia temprana), ictericia sin hemoglobinemia y hemoglobinuria, lo que indica que la hemólisis intravascular no es una característica de la enfermedad (Richey y Palmer, 1990, Kocan y col., 2003). La gravedad de los signos clínicos se asocia con el grado de anemia. A medida que disminuye el hematocrito, que coincide con el aumento de la parasitemia, los animales se vuelven más débiles y letárgicos y presentan anorexia y pérdida de peso (Richey y Palmer, 1990, Kocan, de la Fuente, Blouin y col., 2010).

La producción de leche disminuye en las vacas lactantes y las vacas preñadas pueden abortar. Los toros pueden desarrollar infertilidad temporal. Con la enfermedad avanzada, el ganado puede desarrollar atonía gastrointestinal, estasis ruminal y estreñimiento, que se asocian con deshidratación y pérdida de peso. Algunos animales pueden experimentar alteraciones neurológicas, que se han atribuido a episodios de anoxia cerebral (Kocan, de la Fuente, Blouin y col., 2010).

Los bovinos infectados desarrollan una enfermedad clínica de leve a grave, especialmente los animales mayores de dos años, llegando la tasa de mortalidad hasta el 50-60% en adultos. A menudo la muerte ocurre dentro de las 24 a 36 horas del pico de parasitemia, cuando hasta el 90% de los eritrocitos se encuentran parasitados (Richey y Palmer, 1990). Por el contrario, la recuperación es más común en animales jóvenes. Los terneros son susceptibles a la infección por *A. marginale*, pero son relativamente resistentes a la enfermedad clínica (Valdez y col., 2002). Este fenómeno no se comprende bien, pero la extirpación del bazo hace que los terneros sean completamente susceptibles a la infección, siendo a menudo más grave la anaplasmosis en los terneros esplenectomizados que la observada en el ganado mayor (Kocan y col., 2003). Sin embargo, una vez que los terneros se infectan, desarrollan infecciones persistentes e inmunidad de por vida a la anaplasmosis. También se ha postulado que la inmunidad innata podría jugar un papel importante, ya que en terneros jóvenes, un número relativamente alto, hasta un 75% de las células T circulantes son linfocitos T  $\gamma\delta$  CD2<sup>-</sup> WC1<sup>+</sup> (Hein y Mackay, 1991). El papel específico de los linfocitos T  $\gamma\delta$  en la



sangre periférica y el bazo de los rumiantes se desconoce en gran medida, aunque se ha demostrado que en el ganado actúan como células presentadoras de antígeno a los linfocitos T CD4 (Collins y col., 1998).

Los hallazgos *post mortem* son inespecíficos y principalmente atribuibles a anemia hemolítica grave. Así, en la necropsia encontramos animales anémicos, ictéricos, sobre todo si el animal muere en los últimos estados de la infección aguda, con esplenomegalia y hepatomegalia. Los linfonódulos pueden estar aumentados y la sangre se presenta clara y fluida. La pulpa esplénica es de color rojo a marrón oscuro y tiene una consistencia blanda, mientras que el hígado presenta hemorragias y un color amarillo anaranjado con la vesícula biliar distendida y repleta de bilis espesa de color marrón o marrón amarillento (Theiler, 1910, Richey y Palmer, 1990, Sevilla y col., 2002). Los hallazgos microscópicos en el tejido hepático incluyen inflamación de las células parenquimatosas, necrosis centrolobulillar con retención de bilis y hemosiderosis en células parenquimatosas y células de Kupffer (Allen y col., 1981a). A menudo se aprecian equimosis y petequias en superficies serosas, especialmente en el corazón y el pericardio, abomaso y en los riñones. Los cambios en los riñones incluyen la infiltración de proteínas de la luz de los túbulos y el espacio capsular con degeneración de las células tubulares. También se observa con frecuencia la musculatura cardíaca con una tonalidad pálida y con un menor tono muscular (Allen y col., 1981a, Sevilla y col., 2002, Coetzee y col., 2005).

- Hallazgos laboratoriales

Dentro de las alteraciones descritas en la hematología es frecuente encontrar anemia, observándose una reducción significativa del recuento de glóbulos rojos, el hematocrito y la concentración de hemoglobina (Richey y Palmer, 1990, Nazifi y col., 2012). La anemia suele ser regenerativa, más en animales que superan la fase aguda, en los que la parasitemia ya ha disminuido de forma marcada (Sevilla y col., 2002). No hay evidencia de supresión de la médula ósea en animales con anaplasmosis y los parámetros hematológicos regresan gradualmente a valores normales varias semanas después (Richey y Palmer, 1990). Los recuentos de glóbulos blancos aumentan después de la parasitemia máxima, así como durante la recuperación, y en este mismo estudio también se observó una disminución de la albúmina y un aumento de las gammaglobulinas (Allen y col., 1981b), mientras que las proteínas totales no se han visto afectadas (Ashuma y col., 2013). El número de plaquetas suele encontrarse dentro del rango normal en la mayoría de los animales infectados, sin embargo, algunos animales pueden mostrar trombocitosis (Ashuma y col., 2013).

La naturaleza hemolítica de la anemia se refleja en un aumento significativo de la bilirrubina no conjugada durante la fase aguda (Sevilla y col., 2002), así como la bilirrubina total sérica y la bilirrubina directa (Allen y col., 1981a). Se ha sugerido la existencia de daño visceral por un aumento significativo de AST sérica, especialmente en animales gravemente afectados (Allen y col., 1981a, Coskun y col., 2012), y aunque no se ha observado que se produzcan cambios significativos en los niveles de ALT, pueden encontrarse por encima del rango fisiológico (Ashuma y col., 2013). El nitrógeno ureico en suero y la fosfatasa alcalina se encuentran también aumentados a causa de la destrucción de los eritrocitos por el sistema reticuloendotelial y el daño celular tanto en el hígado como en el riñón (Allen y col., 1981a, Coskun y col., 2012).

- Diagnóstico

El diagnóstico, se puede llevar a cabo utilizando métodos directos, como la evaluación con microscopio óptico de frotis de sangre teñidos con tinciones habituales para hematología o mediante la detección de ADN bacteriano empleado técnicas moleculares. Asimismo, pueden emplearse métodos indirectos, como es el caso de las técnicas serológicas.

Una de las principales dificultades del diagnóstico directo mediante la identificación microscópica de *A. marginale* en frotis de sangre periférica teñidos con Giemsa, Wright Giemsa o Diff-Quick, es que puede resultar difícil distinguir sus cuerpos de inclusión intraeritrocitarios del punteado basófilo en los reticulocitos y eritrocitos inmaduros y los cuerpos de Howell-Jolly y, posiblemente, otras partículas con forma parecida en los eritrocitos. Además, esta técnica puede no ser fiable en casos avanzados de la enfermedad, cuando los animales padecen anemia grave, ni en las muestras recolectadas en la necropsia. Las inclusiones de *A. marginale* tampoco son evidentes en los frotis de sangre antes de que aparezcan los signos clínicos ni en el ganado persistentemente infectado porque los niveles de parasitemia son bajos en el torrente sanguíneo, lo que hace muy difícil su detección a través de este método. Sin embargo, sería importante detectar *A. marginale* en estos animales por el papel crítico que juegan en la epidemiología de la anaplasmosis (Theiler, 1910, Theiler, 1911, Potgieter y Stoltz, 2004, Kocan, de la Fuente, Blouin y col., 2010).

Las técnicas moleculares, como la PCR, convencional y anidada, se desarrollaron para la detección específica de las especies de anaplasma (Molad y col., 2006). Han demostrado ser métodos muy sensibles, sobre todo en los animales portadores, aunque no aportan información cuantitativa con respecto a los niveles de rickettsemia.

Esto sí se consigue con la PCR en tiempo real, tratándose de una técnica útil, aunque de un coste elevado, para la evaluación de tratamientos y vacunas (Carelli y col., 2007, Elelu y col., 2016). También se ha desarrollado la técnica de hibridación reversa (*reverse line blot hybridization assay* o RLB, de sus siglas en inglés) que logra detectar e identificar simultáneamente múltiples especies de anaplasma en una muestra, algo muy útil en situaciones de campo, debido a las frecuentes coinfecciones (Georges y col., 2001, Molad y col., 2006). También es posible diferenciar especies de anaplasma de una misma muestra empleando ensayos multiplex de PCR (Aubry y Geale, 2011).

En cuanto a los genes específicos frente a los que se desarrollan los cebadores a emplear en las técnicas moleculares para la detección de *A. marginale*, debe tenerse en cuenta que las proteínas MSP1a, MSP4 y MSP5 están codificados por genes únicos individuales (*msp1a*, *msp4* y *msp5*), conservados y que no varían dentro de los aislados, por lo que fueron unos de los primeros candidatos para el diagnóstico molecular (de la Fuente, Van Den Bussche, Ronald A y col., 2001). Sin embargo, debido a la conservación de *msp5* entre las especies de anaplasma, un ensayo de PCR dirigido solo hacia este gen tendría problemas de especificidad significativos cuando se utiliza en poblaciones donde los animales podrían estar infectados con otras especies del género (Visser y col., 1992, Alleman y col., 2006). Por tanto, los ensayos de PCR se han dirigido hacia los genes *msp1a* y *msp4*, utilizándose para diferenciar cepas de *A. marginale*, lo que puede ser útil para rastrear el origen de un brote, y para diferenciar entre especies de anaplasma (Lew y col., 2002, Vidotto y col., 2006, Shkap y col., 2008).

Las pruebas serológicas utilizadas para el diagnóstico de anaplasmosis comprenden la fijación del complemento y la prueba de aglutinación en tarjeta. La fijación del complemento, aunque es muy específica, con un 98-99% de especificidad, carece de sensibilidad suficiente para el diagnóstico del ganado en el período de incubación o durante la fase de infección persistente, con valores del 14 al 20% (Bradway y col., 2001). La prueba de aglutinación en tarjeta es más sensible, con tasas del 98% en una prueba realizada en bovinos libres de *Anaplasma*. Sin embargo, las reacciones inespecíficas pueden ser un problema, así como la subjetividad en la interpretación de los resultados (Molloy y col., 1999). Además, el antígeno puede ser difícil de preparar y puede variar de un lote a otro y entre laboratorios y requiere la infección de terneros esplenectomizados por inoculación intravenosa (OIE, 2012).

Otros ensayos serológicos, como la IFI o el enzoinmunoensayo (ELISA), presentan como inconveniente la reactividad cruzada de los anticuerpos entre otros organismos del género *Anaplasma*. Concretamente, un ELISA de competición (cELISA)

basado en la proteína expuesta a la superficie MSP5, demostró tener una alta sensibilidad y especificidad (Molloy y col., 1999), pero al reaccionar de forma cruzada con anticuerpos contra otros organismos del género *Anaplasma*, debido a la conservación y similitud del gen *msp5* entre las especies (Visser y col., 1992, Dreher y col., 2005), su uso se limita al género *Anaplasma*, pero no para el nivel de especie. Además, las pruebas serológicas pueden carecer de la sensibilidad suficiente para detectar exposición al agente en muestras de ganado con escasa carga parasitaria, en el período de incubación y durante la infección persistente, o en el ganado que se trata con tetraciclinas, ya que se reduce la rickettsemia y, posteriormente, también los títulos de anticuerpos, con lo que los animales pueden ser serológicamente negativos (Coetzee y col., 2005, Aubry y Geale, 2011). Esto tiene importantes implicaciones para el control de la enfermedad, ya que los brotes pueden ocurrir cuando el ganado bovino, diagnosticado incorrectamente como libre de infección porque resultó negativo en pruebas serológicas, se transporta a áreas no endémicas, como ocurrió en Canadá a principios de los años ochenta (Kocan y col., 2000). En los casos en los que se utilizan técnicas de serología, se debe realizar la confirmación del organismo y la identidad de la especie por métodos de diagnóstico molecular como una herramienta de diagnóstico definitiva, que además confirmen no solo la exposición al agente, sino también la existencia de infección activa (Kocan y col., 2015).

#### ○ Tratamiento

En el tratamiento de la anaplasmosis bovina por *A. marginale* se usan las tetraciclinas y, además, se puede utilizar también el dipropionato de imidocarb de forma individual o combinado con las tetraciclinas, algo que puede resultar muy útil si entre los agentes que se incluyen en el diagnóstico diferencial de un brote se encuentran también las babesiosis, como veremos posteriormente (Sevilla y col., 2002). El dipropionato de imidocarb se administra generalmente al ganado por inyección subcutánea a una dosis de 2,1 mg/kg para la actividad contra *A. marginale* aguda, según la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios.

La terapia antimicrobiana se ha dirigido al tratamiento de animales enfermos, así como a la prevención de la enfermedad, como se tratará más adelante. Se han descrito diferentes posologías de oxitetraciclina para el tratamiento de animales clínicamente enfermos, como el uso de una sola inyección parenteral, eficaz para reducir la gravedad de la enfermedad cuando se administra con menos de un 15% de los eritrocitos parasitados. Cuando hay más de 15%, la eficacia del tratamiento se reduce (Richey y Palmer, 1990) y, en algunos casos, se ha descrito que puede ser

recomendable no tratar, debido a dos razones: en primer lugar porque si el animal se ve obligado a moverse o se excita, podría morir de anoxia aguda; y, en segundo lugar, los tratamientos con antibióticos parecen ser escasamente eficaces en el tratamiento de la enfermedad cuando se administra durante la etapa tardía del desarrollo o la convalecencia (Whiting, 2005). Asimismo, se ha señalado que un único tratamiento con oxitetraciclina de acción prolongada a razón de 20 mg/kg es preferible a los tratamientos diarios repetidos con oxitetraciclina de acción corta, en los que se recomienda una dosis de 6,6-11 mg/kg durante tres días (Richey y Palmer, 1990). En cualquier caso, estas tetraciclinas, utilizadas en sus dosis terapéuticas recomendadas, son efectivas para reducir el nivel de parasitemia y limitar los efectos clínicos.

Ante brotes agudos de la enfermedad, se ha descrito el uso de oxitetraciclina también como medio de protección para el resto del rebaño, buscando conseguir una protección inmediata, pero temporal de los animales que puedan estar infectados, pero que aún no hayan mostrado signos clínicos, seguida de una protección prolongada, basada en el uso profiláctico de la oxitetraciclina, como se verá posteriormente en esta revisión bibliográfica. La protección temporal se logra mediante la administración parenteral de oxitetraciclina de 6,6 a 11 mg/kg (ó 20 mg/kg si se usan las de larga acción), a todos los animales del rebaño de más de seis meses de edad con el objetivo eliminar los signos clínicos durante el período de incubación o durante el tiempo de aumento de la parasitemia (Richey y Palmer, 1990, Kocan y col., 2003).

Por otra parte, se ha tratado de buscar terapias basadas en oxitetraciclina para luchar contra la infección persistente por *A. marginale*. Con este fin se ha utilizado la oxitetraciclina administrada por vía intravenosa o subcutánea a una dosis de 11 a 22 mg/kg durante cinco a diez días, o bien por vía intramuscular a 20 mg/kg en cuatro dosis con un intervalo de tres días (Richey y Palmer, 1990). En este sentido, en un estudio, Coetzee y colaboradores (2005) evaluaron la eficacia de tres posologías con oxitetraciclina de larga acción para eliminar la cepa Oklahoma de *A. marginale* del ganado portador: en un grupo se administraba a 30 mg/kg en una única dosis por vía intramuscular, en otro grupo se usaba la misma dosis pero administrada dos veces con un intervalo de cinco días y el tercer grupo era tratado con 22 mg/kg por vía intravenosa una vez al día durante cinco días. Ninguno de estos tratamientos eliminaron las infecciones en el ganado portador, aunque en un estudio posterior (Coetzee y col., 2006b) se encontró que el tratamiento con oxitetraciclina de acción prolongada a 22 mg/kg por vía intravenosa una vez al día durante cinco días fue efectivo en un solo ternero infectado con la cepa Virginia de *A. marginale*. Este hallazgo podría respaldar la hipótesis de las diferencias de susceptibilidad entre cepas, a lo que

se une la identificación de dos bombas de resistencia a múltiples fármacos en el genoma de la cepa Saint Maries de *A. marginale*, aunque todavía no se ha dilucidado el significado clínico de estas bombas, ni la susceptibilidad entre cepas (Brayton y col., 2005). Sin embargo, ninguno de estos estudios sugiere que los tratamientos analizados fueran exitosos en la eliminación de las infecciones persistentes. Así, en ausencia de medios seguros para eliminar las infecciones persistentes por *A. marginale* en el ganado, se debe restringir el movimiento de animales desde áreas endémicas como medida de precaución para proteger a los animales en zonas no endémicas, tal y como se describirá en el apartado de prevención y control (Kocan y col., 2000, Kocan, de la Fuente, Blouin y col., 2010b).

También, se han utilizado otros antimicrobianos, como, por ejemplo, la clortetraciclina, en el tratamiento de la anaplasmosis. Este fármaco, administrado en la alimentación, con dosis que varían de 1,1 mg/kg durante 120 días a 11 mg/kg durante 60 días, también se ha utilizado para tratar de eliminar la infección en animales portadores (Richey y Palmer, 1990). En esta línea, un estudio de 2010 mostró que la clortetraciclina oral en una ración completa mezclada a tres dosis diferentes, 4,4, 11 y 22 mg/kg/día, durante 80 días fue eficaz en la eliminación de 25 animales persistentemente infectados con la cepa Virginia de *A. marginale* (Reinbold y col., 2010b). En este caso, además de la susceptibilidad entre cepas comentado anteriormente, existe la necesidad de ensayos de campo, ya que algunos animales podrían no obtener la dosis diaria requerida y con cepas de campo de *A. marginale*. Así, en otro estudio se mostraron rendimientos muy por debajo de lo esperado en la eliminación de *A. marginale* empleando clortetraciclina en 62 vacas preñadas infectadas con cepas de campo (Reinbold y col., 2009), especialmente cuando se comparan con el éxito del estudio anterior. A pesar del éxito parcial de la administración de clortetraciclina, este enfoque es costoso, dado el requisito de alimentación continua, los períodos de supresión de carne y leche y el riesgo de desarrollo de organismos o cepas resistentes. Además, el uso diario de antibióticos no es coherente con los principios del uso prudente de antimicrobianos y la prevención de la resistencia a los antimicrobianos (Whiting, 2005, Aubry y Geale, 2011).

Se necesitan nuevos antimicrobianos para tratar la anaplasmosis y un candidato puede ser la enrofloxacin, ya que se ha demostrado buenos resultados *in vitro* en cultivos infectados con la cepa Oklahoma (Coetzee y col., 2006a). Sin embargo, los resultados de los estudios *in vivo* demostraron escasa eficacia para este fármaco, con dos dosis de 12,5 mg/kg administradas por vía subcutánea cada 48 h, al no eliminar infecciones graves por *A. marginale* en terneros esplenectomizados, aunque mejoraba

el curso de la enfermedad (Coetzee y Apley, 2006). En otro estudio de los mismos autores donde se comparaban diferentes antibióticos, los animales tratados con enrofloxacin a 5 mg/kg por vía intravenosa cada 24h durante cinco días tuvieron que ser sacrificados (Coetzee y col., 2006b).

Finalmente, en algunas partes del mundo se han utilizado otros fármacos en el tratamiento de la anaplasmosis, como arsenicales, antimaláricos, derivados del antimonio y colorantes, pero no han mostrado ningún efecto sobre la enfermedad aguda (Potgieter y Stoltz, 2004, Aubry y Geale, 2011).

- Control y prevención

Las medidas de control para la anaplasmosis no han cambiado notablemente en los últimos 60 años. Estas varían según la ubicación geográfica e incluyen el control de artrópodos, mediante la aplicación de acaricidas, su control biológico o mediante vacunas frente a garrapatas, como hemos comentado en las medidas de control y prevención frente a *A. phagocytophilum*, la limitación de los movimientos del ganado entre zonas endémicas y no endémicas para *A. marginale*, la vacunación de los bovinos y el uso profiláctico de antimicrobianos.

Las medidas de control de artrópodos, garrapatas (como vector biológico) e insectos hematófagos (por su transmisión mecánica) pueden requerirse durante todo el año en las regiones donde estos vectores están activos también durante los inviernos cálidos, mientras que en otras áreas, se puede restringir a la temporada de vectores. Probablemente, el control de artrópodos muchas veces no es práctico en muchas áreas, y, además, en el caso *A. marginale* hay que tener en cuenta la transmisión mecánica de sangre infectada de un animal a otro susceptible. Por lo tanto, cualquier actividad que reduzca la transferencia de sangre infectada, como cambiar las agujas y la limpieza de instrumentos contaminados con sangre entre los animales, reducirá la propagación. El ganado que se exporta a áreas no endémicas debe estar completamente libre de infección por *A. marginale*. En áreas donde el ganado persistentemente infectado sea común y contribuya a la estabilidad endémica, puede ser importante mantener esta situación, y no introducir ganado susceptible que muy probablemente se infectará, dando lugar a enfermedad aguda (Richey y Palmer, 1990, Kocan, de la Fuente, Blouin y col., 2010, Kocan y col., 2015).

La vacunación es una forma económica y efectiva de controlar parcialmente la anaplasmosis bovina en todo el mundo. Las vacunas para el control de la anaplasmosis



incluyen dos tipos principales, vacunas muertas y vivas. Ambos tipos de vacunas dependen de eritrocitos bovinos infectados como fuente de antígeno. Mediante la vacunación se induce una inmunidad protectora que reduce o previene la enfermedad clínica, pero no evita que el ganado se infecte persistentemente con *A. marginale* (Kocan, de la Fuente, Blouin y col., 2010). El rendimiento de la vacuna puede verse comprometido por la presencia de muchas cepas de *A. marginale* en un área debido a la falta de protección cruzada entre genotipos (Kocan y col., 2003, Kocan, de la Fuente y col., 2010).

Las vacunas muertas se comercializaron en Estado Unidos desde la década de 1960 hasta 1999, cuando se retiraron del mercado debido a la reestructuración de la empresa comercializadora (Kocan y col., 2003). Tienen varias ventajas sobre las vacunas vivas: un riesgo de contaminación con agentes infecciosos no deseables bajo, un almacenamiento económico y reacciones posteriores a la inoculación mínimas. Las desventajas de las vacunas muertas incluyen la necesidad de revacunaciones anuales, un mayor coste por la purificación de *A. marginale* de los eritrocitos, la falta de protección cruzada entre cepas de áreas geográficas muy separadas, siendo las vacunas más efectivas cuando se preparan a partir de aislados locales, y la inmunidad protectora suele ser menor que la de las vacunas vivas (Figuerola y col., 1999, Kocan y col., 2003).

El uso de vacunas vivas para el control de la anaplasmosis fue iniciado por Theiler a principios del siglo XX y continúa siendo la vacuna de elección en muchas partes del mundo (Theiler, 1911). Las vacunas vivas implican la infección del ganado a través de la inoculación con eritrocitos infectados y tratamiento a dosis bajas de tetraciclina, aunque este método requiere una estrecha vigilancia del ganado y puede no ser aplicable para su uso en grandes rebaños. No está asegurado el éxito en el caso de la aplicación de vacunas vivas que contienen cepas atenuadas de *A. marginale* por irradiación o por pases en hospedadores anormales, como ovejas o ciervos, y vacunas vivas que contienen *A. centrale* cepa Israel, menos patógena (Kuttler y Zaugg, 1988, Wright, 1990). Para la producción de vacunas vivas, los terneros esplenectomizados son mantenidos en condiciones de cuarentena, se inoculan experimentalmente con determinadas cepas y sirven como fuente de sangre infecciosa. Sin embargo, la transmisión de otros hemoparásitos siempre es un riesgo con este enfoque. Otras desventajas son el riesgo de enfermedad hemolítica en terneros nacidos de madres vacunadas y la necesidad de mantener una cadena de frío estricta. Mientras que, como ventaja principal, el ganado vacunado desarrolla infecciones persistentes que inducen



inmunidad protectora de por vida en el ganado contra la enfermedad clínica y, generalmente, no se requiere la revacunación (Kocan, de la Fuente, Blouin y col., 2010).

La vacuna viva que implica infectar al ganado con *A. centrale* es la más ampliamente utilizada para el control de la anaplasmosis bovina. Se ha usado en varias áreas del mundo, incluyendo África, Australia, Israel y América Latina, durante casi un siglo, donde se venden varios cientos de miles de dosis al año, y el uso de la vacuna probablemente continuará hasta que estén disponibles más vacunas efectivas. Theiler observó que *A. centrale* era menos patógena para el ganado y que los bovinos infectados con *A. centrale* desarrollaron inmunidad protectora contra la infección por *A. marginale* de por vida (Theiler, 1911), ya que comparten epítomos inmunodominantes y, por tanto, protección inducida por *A. centrale* contra la enfermedad clínica cuando el ganado se expone a *A. marginale* (Shkap y col., 1991). Los bovinos inoculados con la vacuna viva *A. centrale* generalmente experimentan una enfermedad clínica leve y luego permanecen infectados persistentemente. En un estudio reciente llevado a cabo en Australia, el uso de la vacuna *A. centrale* viva parecía estar justificado porque, aunque la respuesta era variable, la protección contra la exposición al desafío era adecuada en la mayoría de los casos para prevenir la enfermedad (Bock y de Vos, 2001, Shkap y col., 2002). Se puede esperar que el éxito de la vacuna varíe con los genotipos de *A. marginale*, principalmente con poblaciones antigénicamente muy diversas y altamente patógenas a los que están expuestos los bovinos vacunados, siendo éste un desafío en el desarrollo de vacunas frente a esta enfermedad, especialmente en áreas de movimiento continuo de ganado (Kocan y col., 2015). La capacidad de cultivar *A. centrale in vitro* también abre la posibilidad de producir antígeno vacunal sin la necesidad de usar animales esplenectomizados, con a las ventajas que eso supone (Bell-Sakyi y col., 2015).

De forma similar, se usó como vacuna para el ganado *A. marginale* derivado del cultivo IDE8 de células de garrapata, desarrollándose inmunidad protectora y sin signos clínicos de anaplasmosis después de la exposición (Kocan y col., 2001, de la Fuente y col., 2002). Aunque la protección fue parcial y la infección no se previno, se presenta como una alternativa al uso de terneros esplenectomizados con los riesgos que supone. Esta vacuna derivada del cultivo celular debería llenar un vacío que podría utilizarse con aislamientos locales.

Actualmente no se han desarrollado ni comercializado nuevas vacunas que utilicen la tecnología molecular, que probablemente serían un método de control mejorado. Los principales objetivos en la investigación de este tipo de vacunas son

aportar protección cruzada entre genotipos, imitar la respuesta inmunitaria del hospedador como en las infecciones naturales y bloquear la infección tanto en ganado vacuno como en garrapatas (Palmer y col., 1999, Brown, 2001, de la Fuente, Kocan y col., 2010a). En este sentido, se han realizado muchas investigaciones sobre la naturaleza de la respuesta inmunitaria del ganado a la infección por *A. marginale*, así como sobre la identificación y comprensión de antígenos y las principales proteínas de superficie de *A. marginale* en la respuesta inmunitaria (Brown, Shkap y col., 1998, de la Fuente, Thomas y col., 2003, Kocan y col., 2003, Abbott y col., 2005, Kocan, de la Fuente y col., 2010).

Por otra parte, se ha descrito el uso profiláctico de antimicrobianos en la limitación de los efectos clínicos de la infección durante la temporada de vectores en animales aparentemente sanos. Sin embargo, en ocasiones se ha indicado que estos protocolos que pueden emplearse con esta finalidad no evitan que el ganado se infecte ni consigue que los animales persistentemente infectados eliminen la infección (Kocan y col., 2003). Concretamente, ante brotes agudos de anaplasmosis en un rebaño, se ha descrito la administración de oxitetraciclina parenteral cada 28-30 días o clortetraciclina de manera continua en alimentos medicados, mezcla de sales minerales o bloques de alimentación (Richey y Palmer, 1990). Este método ha sido probablemente empleado con mayor frecuencia para la prevención de la anaplasmosis en Estados Unidos que en otras partes del mundo durante la temporada de vectores (Kocan, de la Fuente, Blouin y col., 2010). Estas medidas de profilaxis presentan las mismas desventajas que se han comentado anteriormente con la eliminación de portadores, al ser costosas, a menudo no aplicable al ganado por la dificultad de manejo y el riesgo de causar la selección de cepas resistentes que conlleva el uso intensivo de antibióticos.

#### **2.2.1.3. *Anaplasma centrale***

*A. centrale* es un parásito en los eritrocitos de los rumiantes, principalmente del ganado, que presenta diferencias morfológicas y patogénicas con respecto a *A. marginale*, con la que está estrechamente relacionada. Esta bacteria está ampliamente extendida en regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo. *A. centrale* se descubrió originalmente en Sudáfrica y desde entonces se ha descrito su presencia en el resto de África, Australia, el sur y el este de Asia y en muchos países de América Latina, en parte debido a su uso como vacuna viva contra la anaplasmosis causada por *A. marginale* (Theiler, 1911, Uilenberg, 1995, Rar y Golovljova, 2011). *A. centrale* causa anemia leve en la mayoría de los casos de infección en el ganado. Estas infecciones son

comunes y a menudo se presentan como infecciones mixtas con *A. marginale* (Khumalo y col., 2016). Principalmente afecta al ganado bovino, pero también a ovinos y rumiantes silvestres (Kuttler, 1984). Su importancia se debe a que da lugar a resistencia contra *A. marginale*, por lo que se utiliza para la preparación de vacunas vivas, asegurando la protección inmunológica contra la anaplasmosis bovina (Kocan y col., 2003).

En 1911 Theiler describió una subespecie de *A. marginale*, *Anaplasma centrale*, que parecía ser menos patógena, causando en general una anaplasmosis leve en el ganado, ya que las reacciones febriles no eran tan graves. Únicamente en uno o dos casos se observó el desarrollo de una anemia más grave, no siendo suficiente para causar la muerte, y, en general, la recuperación ocurría mucho más rápido que en los animales de experimentos anteriores. También se observó una diferencia en la apariencia de los anaplasmas, tanto en tamaño, que, sin precisar el diámetro, se describía que eran algo menores, como en su posición en los eritrocitos, no situados constantemente en el margen, sino a cierta distancia, más centralmente (Theiler, 1911). Con el fin de distinguir entre estos dos anaplasmas, Theiler designó este como *Anaplasma marginale* (variedad *centrale*), indicando que era una variedad de *Anaplasma marginale*. Además, concluyó que la inoculación de *A. marginale* (variedad *centrale*) confería inmunidad suficiente para proteger a los animales de la enfermedad grave o la muerte causada por *A. marginale*, pero no impedía la reinfección, por lo que consideró que ambas anaplasmas representaban dos variedades de la misma especie y sugería la posibilidad de utilizar una infección con la variedad *centrale*, que al final de artículo nombraba como *Anaplasma centrale*, para proteger a los animales en situaciones de campo contra *A. marginale* (Theiler, 1911).

#### ○ Bacteriología y epidemiología

*A. centrale* es una bacteria intracelular obligada que parasita los eritrocitos de los rumiantes, localizándose en vacuolas que se sitúan en la parte central (Theiler, 1911), casi circulares, con un diámetro que varía de 0.3 a 1  $\mu\text{m}$  (Hove y col., 2018). *A. centrale* se ha propagado con éxito *in vitro* en líneas celulares de garrapatas derivadas de las especies de ixódidos, en cultivos de la línea celular RAE25 de *Rhipicephalus appendiculatus* y en la línea celular *Dermacentor variabilis* DVE1 (Bell-Sakyi y col., 2015).

Según estudios filogenéticos realizados con las secuencias del gen 16S ARNr y *groEL*, *A. centrale* se encuentra estrechamente relacionada con *A. marginale*, así como

con *A. ovis*, hecho que estaría respaldado por otras características genéticas, fenotípicas y antigénicas, pero en ramas separadas. Durante los análisis filogenéticos para diferenciar cepas de *A. marginale* usando secuencias *msp4*, se ha observado que quedarían en dos grupos separados estas especies, con *A. centrale* y *A. ovis* en uno y *A. marginale* en otro (Dumler y col., 2001, Inokuma y col., 2001). Sin embargo, una de las más importantes diferencias entre especies es el gen *msp1α*, que solo se conserva en *A. marginale* y se ha demostrado que participa en la adhesión a los eritrocitos bovinos y células de las garrapatas, por lo que se utiliza para diferenciar ambas especies (de la Fuente, García-García, Blouin y Kocan, 2001, Lew y col., 2002, de la Fuente, Torina y col., 2005).

Posteriormente, se ha secuenciado el genoma completo de *A. centrale*, encontrándose que contiene genes que no se encuentran en las cepas de *A. marginale*, y, de forma similar, genes encontrados en cepas de *A. marginale* están ausentes de *A. centrale*. Esta divergencia es consistente con la nomenclatura de subespecies, pero estos hallazgos no permitían resolver una cuestión planteada desde el descubrimiento de estos anaplasmas: si *A. centrale* debía clasificarse como una especie distinta dentro del género *Anaplasma* o como una subespecie de *A. marginale* (Herndon y col., 2010). Por ello, se encuentra en la bibliografía autores que se refieren a esta bacteria como *A. centrale* y otros la consideran como una subespecie de *A. marginale*, con su nomenclatura de *A. marginale* subespecie *centrale* (Dumler y col., 2001, Herndon y col., 2010). Sin embargo, recientemente, se ha obtenido la secuencia completa del gen 16S ARNr y las secuencias de aminoácidos deducidas para *groEL* y *msp4* de varios aislados de *A. marginale* y *A. centrale*. Los análisis filogenéticos de estas secuencias demuestran consistentemente que *A. centrale* forma una rama separada de *A. marginale* y, por tanto, hay divergencia entre estos dos organismos (Khumalo y col., 2018). Por otra parte, gracias al genotipado de *msp1aS*, se han identificado por primera vez 32 genotipos de *A. centrale* distintos de la cepa vacunal, revelando la diversidad genética de las cepas de *A. centrale* en el ganado y la vida silvestre (Carelli y col., 2008, Ceci y col., 2008, Khumalo y col., 2016).

La **transmisión** de *A. centrale* puede ocurrir mecánicamente, mediante la inoculación sanguínea, o biológicamente, por sus garrapatas vectores. Solo se ha demostrado que la garrapata africana *Rhipicephalus simus* transmite *A. centrale* transestadialmente (Potgieter y van Rensburg, 1987b), aunque también podría transmitirse por *Rhipicephalus appendiculatus*, algo que aún no se ha confirmado mediante la realización de estudios de transmisión (Hove y col., 2018). En un estudio se demostró que ni *Hyalomma excavatum*, ni *Rhipicephalus sanguineus*, ni

*Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* son capaces de transmitir *A. centrale*. Aunque fue posible amplificar un fragmento específico de ADN de *A. centrale* a partir de las glándulas salivales de *R. sanguineus*, no se produjo transmisión al ganado susceptible (Shkap y col., 2009). Sin embargo, el ADN de esta bacteria también se ha detectado en *Haemaphysalis punctata*, indicando su posible importancia en la epidemiología de *A. centrale* en Europa (Palomar y col., 2015), en especies del género *Amblyomma* en Etiopía (Teshale y col., 2015) y en *Haemaphysalis longicornis*, que se ha sugerido como vector potencial en Japón (Kawahara y col., 2006).

Al igual que lo descrito para *A. marginale* y *A. phagocytophilum*, la transmisión transplacentaria es posible para *A. centrale* (Potgieter y van Rensburg, 1987a). De hecho, en un estudio en Uganda, se atribuye a la transmisión transplacentaria el que el ganado de menos de un año presente una prevalencia de infección de *A. centrale* significativamente más altas que los animales un año (Byaruhanga y col., 2018).

No ha habido mucho interés en la **epidemiología** de *A. centrale*, y la mayoría de las veces, cuando se detecta en el ganado vacuno, no se caracteriza la cepa y se supone que se debe a la vacunación, quedando los animales como persistentemente infectados (Khumalo y col., 2016). Durante mucho tiempo, se consideró que el ganado vacuno era el único **hospedador** de *A. centrale*, pero recientemente la infección también se ha reconocido en ovinos, en búfalo (*Bubalus bubalis*), búfalo africano (*Syncerus caffer*), corzo (*Capreolus capreolus*), ciervo común (*Cervus elaphus*), ciervo sica (*Cervus nippon*), ñu negro (*Connochaetes gnou*), ñu azul (*Connochaetes taurinus*), antílope acuático (*Kobus ellipsiprymnus*) y antílope eland (*Taurotragus oryx*) (Rajput y col., 2005, Kawahara y col., 2006, Portillo y col., 2011, Hosseini-Vasoukolaei y col., 2014, Teshale y col., 2015, García-Pérez y col., 2016). *A. centrale* es muy prevalente en búfalos en África, lo que sugiere que podrían ser **reservorios** de este agente (Oura y col., 2011, Eygelaar y col., 2015, Sisson y col., 2017). Se ha especulado que hay circulación de cepas no vacunales de *A. centrale* entre diferentes hospedadores, lo que conduce a una gran diversidad de genotipos, gracias a una circulación de cepas en la naturaleza que experimentan selección y cambio, separadamente de la cepa vacunal. Así, se ha sugerido que la vida silvestre podría ser reservorio de la infección por *A. centrale*. Sin embargo, se desconoce cómo se mantienen las cepas detectadas en los animales silvestres en la naturaleza (Khumalo y col., 2016, Byaruhanga y col., 2018).

- *Situación en España*

En España no se ha detectado *A. centrale* en ganado vacuno. Sin embargo, se ha identificado en un corzo de 105 analizados y en un ciervo de los 26 en un estudio entre Asturias y el País Vasco (García-Pérez y col., 2016), mientras que en otro estudio en La Rioja la prevalencia fue del 33,3% en ciervos (7/21) (Portillo y col., 2011) y se amplificó ADN de este agente en dos garrapatas identificadas como *Haemaphysalis punctata* recogidas de una vaca y otra de la vegetación (Palomar y col., 2015).

- Patogenia

La entrada y replicación de *A. centrale* en el intestino medio y posteriormente en las glándulas salivales ocurre como en el ciclo básico de desarrollo de *A. marginale* dentro de la garrapata. Sin embargo, la transmisión biológica de esta especie bacteriana no está del todo clara, por lo que muchos de los aspectos de la patogenia dentro de la garrapata siguen siendo desconocidos. Así, parece que la transmisión de *A. centrale* cepa Israel por parte de garrapatas *Rhipicehalus sanguineus* y *Dermacentor andersoni* no es del todo eficiente, tal y como se describió en un estudio con *Rhipicehalus sanguineus* (Shkap y col., 2009), incluso cuando se utilizó en la alimentación cien garrapatas infectadas, *Dermacentor andersoni*, infectadas para su transmisión (Ueti y col., 2009). Esto se debe a una dosis menor de organismos secretados en la saliva de la garrapata. En una comparación entre *A. centrale* cepa Israel y *A. marginale* cepa St. Maries, esta última de alta eficiencia de transmisión, se observó que ambas invaden y colonizan las células del acini granular dentro de la glándula salival, pero con diferencias en la secreción de patógenos en la saliva y en la morfología de la estructura de la colonia. En el caso de la cepa St. Maries más del 90% de las garrapatas resultaron infectadas, mientras que solo el 30% de las garrapatas fueron positivas en muestras de saliva para la cepa vacunal y los niveles fueron 10 veces más bajos que los de la cepa St. Maries (Ueti, Massaro W. y col., 2007). Con respecto a la morfología, la cepa Israel formó colonias individuales que contenían pocos organismos con morfología del estado replicativo, mientras que la cepa de St. Maries formó colonias múltiples situadas cerca de los gránulos y con conteniendo densamente empaquetada con la morfología asociada con el estado replicativo (Ueti y col., 2009). Por tanto, se concluyó que la transmisión de *A. centrale* cepa Israel requiere 35 veces más garrapatas, lo que supuso un total de 425 garrapatas adultas de *D. andersoni*, que, alimentándose durante siete días en un ternero, lograron la transmisión exitosa (Ueti y col., 2009). Es probable que estos resultados reflejen las diferencias específicas de especie en las interacciones vector-patógeno que afectan la replicación del patógeno y las vías de secreción en la garrapata. Estos resultados ilustran la complejidad de las relaciones de co-evolución vector-patógeno. Como ha ocurrido durante aproximadamente 70 años, la cepa



vacunal de *A. centrale* se ha mantenido solo por inoculación intravenosa, eliminando cualquier presión selectiva de la población que ocurriría durante el ciclo de transmisión natural, lo que ha dado lugar a heterogeneidad genética (Kocan, de la Fuente, Blouin y col., 2010, Herndon y col., 2013).

Además, hasta hace poco no se conocía la proteína MSP1aS de *A. centrale* (para la que aun hoy se desconocen sus funciones) (Khumalo y col., 2016), por lo que no se comprende completamente el mecanismo de infección de las células del hospedador vertebrado y del vector, al carecer de una proteína MSP1a, similar a la de *A. marginale*, que se adhiere a eritrocitos bovinos y células de garrapatas. Se considera que existe una relación entre el genotipo *msp1α* y el fenotipo transmisible por garrapatas en *A. marginale*, por lo que aún queda por dilucidar si está involucrado en la capacidad de transmisión y en la invasión de los eritrocitos del hospedador por parte de *A. centrale* un mecanismo mediado por MSP1aS (Kocan, de la Fuente, Blouin y col., 2010, Kocan, de la Fuente y col., 2010, Shkap y col., 2009).

- Signos clínicos y lesiones

*A. centrale* generalmente causa una forma más leve y menos virulenta de anaplasmosis bovina (Theiler, 1911). Los animales presentan con mayor frecuencia reacciones febriles no tan graves en comparación con las observadas en las infecciones por *A. marginale*. Sin embargo, ocasionalmente y de forma puntual puede alcanzar valores de 39,5 a 40,5°C, como observó Theiler durante sus investigaciones en doce animales (1911) cuyo aumento en la virulencia pudo ser ocasionada por los pases realizados en los terneros y por usar cantidades mayores de sangre para la infección. La recuperación de estos animales, en general, ocurrió mucho más rápido que en los experimentos de infección realizados con *A. marginale* y en ninguno de estos casos causó la muerte (Theiler 1911). Sin embargo en una prueba vacunal, una vaca frisona murió tras la inoculación de la vacuna de *A. centrale* (Pipano y col., 1985).

Se han descrito, durante pruebas de vacunación la existencia de ligera ictericia, anorexia, decaimiento y disminución de la producción de leche (Pipano y col., 1985, Brizuela y col., 1998), aunque previamente, como incluye Pipano y colaboradores en su discusión, estos signos se han descrito en pruebas de inoculación.

Es importante tener presente que los signos clínicos dependen de la cepa, así como del hospedador. En este sentido, se ha descrito que la cepa CC identificada en Italia en un caso concreto de una vaca frisona de 4 años de edad, los signos clínicos

consistieron en bajada de la producción de leche, palidez de las mucosas, depresión y temperatura elevada, de 40 a 40,5°C (Ceci y col., 2008, Carelli y col., 2008). En cuanto a las características del hospedador, parece que las vacas de leche, así como los animales adultos en general podrían presentar un cuadro clínico más grave (Pipano y col., 1985, Kocan y col., 2003).

- Hallazgos laboratoriales

La descripción de hallazgos tanto en el hemograma como en la bioquímica sanguínea es muy escasa, dado el carácter leve del agente, hecho que hace que la infección pase desapercibida la gran mayoría de los animales. En aquellos casos en los que la cepa es más patogénica o cuando se producen fallos vacunales, se ha observado una anemia normocítica normocrómica y trombocitopenia durante la fase aguda de la enfermedad (Carelli y col., 2008). En esta línea, Pipano y colaboradores documentan un hematocrito en una vaca de leche de un 17% (Pipano y col., 1985).

- Diagnóstico

Es posible la detección directa del parásito en frotis de sangre teñidos con Giemsa, Wright Giemsa o Diff-Quick por microscopía óptica (Carelli y col., 2008). Así, mediante observación directa, es posible determinar la presencia intraeritrocítica de inclusiones basófilas densas y redondeadas con la localización central, típica de *A. centrale* (Theiler, 1911, Carelli y col., 2008), a partir del día 14 a 30 de infección (Melendez y col., 2003). El método no es muy sensible ni específico y requiere de experiencia. Por lo tanto, se usa junto con otros ensayos para confirmar la infección (Hove y col., 2018).

Se han utilizado ensayos moleculares y serológicos para la detección de ganado persistentemente infectado vacunado con *A. centrale* con el principal objetivo de investigar los fallos en la vacunación contra la anaplasmosis (Molloy y col., 2001, Shkap y col., 2008).

La PCR basada en la detección de *msp5*, un gen altamente conservado y compartido entre todas las especies de anaplasma (Visser y col., 1992, Palmer y col., 1998), no puede discriminar entre *A. centrale* resultante de la vacunación en animales persistentemente infectados de la infección en el campo por *A. marginale*. Con el objetivo de discriminar la vacuna contra la infección por *A. marginale*, se han desarrollado numerosos ensayos de PCR, convencional, anidada y cuantitativa en



tiempo real, y de RLB, que ofrece la ventaja de la detección simultánea de ambas especies, siendo interesante para determinar el estado epidemiológico de un rebaño vacunado en un área endémica (Molad y col., 2006, Shkap y col., 2009, Chaisi y col., 2017). En un estudio donde se compararon las técnicas moleculares RLB, PCR anidada y cuantitativa, se concluyó que la PCR cuantitativa era la más sensible (Chaisi y col., 2017). Se han diseñado cebadores basados en diferentes secuencias genómicas para la amplificación específica del ADN de *A. centrale*. Los ensayos dirigidos concretamente a la secuencia de *A. centrale mpb58* parecen capaces de detectar específicamente *A. centrale* con un nivel de sensibilidad de 0,00001% de eritrocitos infectados, o 500 células infectadas/ml (Shkap y col., 2002, Molad y col., 2006). Para aumentar la sensibilidad de 500 a 50 células infectadas, se diseñó otro conjunto de cebadores, basado en secuencias del operón *msh2* de *A. centrale* (Molad y col., 2006). Otros cebadores diseñados específicamente para *msh3* y *msh4* de *A. centrale* pudieron detectar el agente durante, al menos, tres meses después de la inoculación cruzada heteróloga, en cuyo momento se interrumpió la monitorización (Shkap y col., 2008). Los portadores de *A. centrale* se detectaron específicamente con los cebadores *msh4* en muestras de campo de ganado en una región endémica de anaplasmosis (Shkap y col., 2008). La última prueba genética basada en *msh1a* también discrimina cepas de *A. centrale* y evalúa el grado de diversidad a través de las repeticiones MSP1aS (Khumalo y col., 2016).

Asimismo, parece que las pruebas serológicas también son capaces de detectar a los bovinos expuestos a *A. centrale*, lo que resulta especialmente útil, al igual que para las pruebas moleculares, para la detección del ganado vacunado y su diferenciación de los animales infectados por *A. marginale* (Molloy y col., 2001).

Tal y como se comentó en el apartado de diagnóstico de *A. marginale*, estas dos especies han demostrado reacciones serológicas cruzadas en la fijación del complemento, la prueba de aglutinación en tarjeta, las pruebas de IFI y cELISA basado en el antígeno MSP5. Por tanto, con estas técnicas no se podía distinguir entre las diferentes especies de anaplasma (Wright, 1990, Visser y col., 1992, Molloy y col., 1999, de la Fuente, Lew y col., 2005), hasta que se identificaron antígenos de *A. centrale* de la cepa de la vacuna utilizada en Australia específicos para el desarrollo de pruebas específicas de especie que claramente diferencia entre ambas especies (Molloy y col., 2001). Molloy y colaboradores (2001) desarrollaron un test de inmunofluorescencia directa basada en el antígeno de *A. centrale* de 80 kDa para diferenciar entre *A. marginale* y *A. centrale* en infecciones patentes y un cELISA basado en el antígeno 116 kDa para la identificación serológica del ganado vacunado. La prueba de

inmunofluorescencia fue capaz de diferenciar ambos agentes, mientras que el cELISA fue altamente sensible (con una sensibilidad del 97,1 al 100% en prueba de laboratorio y de campo) y específico (con una especificidad del 97,9 al 100%, también de forma experimental como de campo) detectando animales portadores hasta nueve años después de la vacunación sin disminución aparente en la sensibilidad (Molloy y col., 2001).

- Tratamiento

Los trabajos que hacen referencia al tratamiento de la infección por *A. centrale* en ganado vacuno son muy escasos, dada la escasa frecuencia de presentación de enfermedad clínica. En un estudio donde se compara la respuesta a la vacunación de vacas de leche adultas y terneros de raza frisona, se determina el uso de tratamiento intravenoso con oxitetraciclina soluble en agua a una dosis de 10 a 15 mg/kg en animales con valores por debajo del 20 a 22% de hematocrito o parasitemia superior al 5% (Pipano y col., 1985). El 70% de las 60 vacas inoculadas con la vacuna necesitaron tratamiento y una en concreto murió a pesar de ser tratada. En otro estudio sobre seguridad de la vacuna donde el 19% de las 21 novillas incluidas en el estudio necesitaron tratamiento, el criterio de tratamiento fue un hematocrito menor o igual a 15% o una parasitemia mayor o igual a 7,5%, se usó oxitetraciclina de larga acción a una dosis de 20 mg/kg intramuscular (Brizuela y col., 1998).

- Control y prevención

Dado el carácter leve de la anaplasmosis causada por *A. centrale*, no se emplean por lo general medidas preventivas frente a este agente concreto. La lucha se centra en evitar la infección por la especie estrechamente relacionada *A. marginale*.

### **2.2.2. BABESIOSIS**

La babesiosis es causada por protozoos intraeritocitarios del género *Babesia* que, junto a los géneros *Entopolypoides* y *Echinozoon*, pertenece a la familia *Babesiidae*, del orden *Piroplasmida*, clase *Aconoidasida*, filo *Apicomplexa*, un linaje eucariota de ramificación temprana, caracterizado por la presencia de un complejo apical y un citoesqueleto único distinto del de otros eucariotas, donde se agrupan los parásitos de la sangre transmitidos por un amplio espectro de especies de garrapatas ixódidas que parasitan principalmente a mamíferos y varias especies de aves en todo el mundo (Levine, 1971, Mehlhorn y Shein, 1984, Gordon y Sibley, 2005).

Fue a finales del siglo XIX cuando Babeş descubrió unos microorganismos intracelulares, que en un principio consideró como bacterias, redondos, a menudo pares, en los glóbulos rojos de las vacas enfermas en Rumanía y los asoció con hemoglobinuria bovina, o la llamada fiebre del agua roja, lo que hoy conocemos como babesiosis bovina (Babeş, 1888). Babeş nombró a la nueva especie como *Hematococcus bovis*, actualmente *Babesia bovis* (Mihalca y col., 2010). Posteriormente, en 1893, el agente de la fiebre del ganado de Texas en Estados Unidos recibió el nombre de *Pyrosoma bigeminum* por Smith y Kilborne (Smith y Kilborne, 1893). Es este mismo año Starcovici erigió el género *Babesia* para incluir a las especies *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*, que se habían descubierto hasta ese momento (Starcovici, 1893, Mihalca y col., 2010). Desde entonces se utilizaron otros nombres genéricos, como *Piroplasma* y *Babesiella*, pero posteriormente todos confluyeron a *Babesia*. El nombre de piroplasma hace referencia a la forma piriforme, en forma de pera, de los parásitos en las etapas intraeritrocíticas debido a la multiplicación observada al microscopio. Este término aún sobrevive, agrupando comúnmente bajo la denominación de piroplasmosis tanto a las babesiosis como a las theileriosis (Uilenberg, 2006).

La forma clásica de identificación y clasificación de las babesias se ha basado en gran medida en observaciones microscópicas, ultraestructurales y de ciclo de vida, principalmente atendiendo a la morfología, al patrón de invasión directo de los eritrocitos por los esporozoitos, en donde no forman pigmentos, a la transmisión transovárica en el hospedador invertebrado y a la susceptibilidad a fármacos. Todos los parásitos de la familia *Babesiidae* tienen una etapa sexual dentro del vector, seguida de una etapa asexual dentro de los eritrocitos del hospedador vertebrado (Levine, 1971, Mehlhorn y Shein, 1984, Kjemtrup y Conrad, 2000, Uilenberg, 2006).

Morfológicamente, se dividen tradicionalmente en especies pequeñas, con una longitud de los estadios intraeritrocíticos entre 1 y 2,5  $\mu\text{m}$ , y especies grandes, entre 2,5 y 5,0  $\mu\text{m}$ . Esta diferenciación morfológica permitió hacer una clasificación inicial. Mehlhorn y Shein, con estudios comparativos biológicos y morfológicos, diferenciaron tres grupos: (1) especies de *Babesia sensu stricto*; (2) *Babesia equi*, *Babesia microti* y otras especies; y (3) especies de *theileria* (Mehlhorn y Shein, 1984). Sin embargo, el estatus taxonómico de algunas especies clasificadas en el grupo 2 por Mehlhorn y Shein en 1984, no quedaba claro y, por ello, fue necesario emplear análisis genéticos para aclarar la situación filogenética mediante la amplificación y secuenciación de los genes de la subunidad pequeña del ARN ribosómico. Esto dio como resultado la aparición de nuevos grupos y nueva información sobre la posición taxonómica de estos organismos, gracias a la construcción de árboles filogenéticos (Homer y col., 2000). Durante la caracterización filogenética basada en las secuencias del gen 18S ARNr se mostró que

los dos grupos morfológicos de babesias grandes y pequeñas son parte de dos grupos filogenéticos distintos, con la excepción de *B. divergens*, que parece una babesia pequeña en frotis de sangre, entre 0,4 y 1,5  $\mu\text{m}$ , pero está genéticamente relacionada con las babesias grandes (Homer y col., 2000, Hunfeld y col., 2008). Además, se ha considerado la creación de una nueva familia (*Nicolliidae*), junto a la familia *Babesiidae*, en la cual se propone agrupar a *Babesia (Theileria) equi* (Allsopp, M. T. y col., 1994), aunque otros autores la mantienen en la familia *Theileriidae* (Kjemtrup, A. M. y col., 2000). Asimismo, *Babesia rodhaini* y *Cytauxzoon felis*, por sus similitudes fenotípicas y filogenéticas, deberían ser reclasificadas dentro de una familia separada (Allsopp y col., 1994). En esta nueva familia también se podría agrupar a *Babesia microti* junto con otra especie de estatus taxonómico poco claro, *Theileria annae* (Zahler y col., 2000). Junto a las familias *Babesiidae* y *Theileriidae*, y a la familia que agruparía a *B. microti* junto a *B. rodhaini*, Kjemtrup y colaboradores (2000) describieron tras sus análisis filogenéticos un cuarto grupo en el que se incluiría a las especies de babesia occidental de la costa oeste de Estados Unidos, que afectan a seres humanos y a rumiantes silvestres (Kjemtrup y col., 2000). En análisis filogenéticos posteriores se añadirían al grupo donde se encuentran *B. microti* y *B. rodhaini* todas las especies de babesia que afectan a los felinos de África, incluyendo *Babesia leo* que es diferente de *C. felis* (Penzhorn y col., 2001).

En un intento por mejorar la comprensión de la taxonomía, Criado-Fornelio y colaboradores (2003) llevaron a cabo el análisis de un conjunto de árboles filogenéticos contruidos con secuencias parciales y completas del gen 18S ARNr, a partir del cual sugirió la división en cinco ramas distintas:

- el grupo *B. microti*, que contiene a *B. rodhaini*, *B. felis*, *B. leo*, *B. microti* y un aislado canino *B. microti-like*, *T. annae*;
- el grupo *Theileria*-like de Estados Unidos occidental que contiene *Babesia conradae*;
- el grupo *Theileria*, que contiene todas las especies de theileria de los bovinos;
- un primer grupo de especies de babesia *sensu stricto*, que incluye a *B. canis* y *B. gibsoni* de los caninos, junto con *B. divergens* y *B. odocoilei*; y
- un segundo grupo de especies de babesia *sensu stricto* compuesto principalmente por las babesias de los ungulados *B. caballi*, *B. bigemina*, *B. ovis*, *B. bovis* y otras especies de babesia del ganado (Criado-Fornelio y col., 2003, Kjemtrup y col., 2006).

Sin embargo, el estatus de estos grupos propuestos aún no ha sido clarificado, aunque parece que podrían considerarse como nuevas familias del orden *Piroplasmida* (Criado-Fornelio y col., 2003).

Actualmente se conocen más de 100 especies del género *Babesia*, siendo algunas de ellas patógenas, mientras que otras se consideran moderadamente patógenas o benignas. Son capaces de infectar a una amplia gama de hospedadores vertebrados mamíferos, tanto domésticos como salvajes, incluso incluyéndose ocasionalmente al ser humano, y también a varias especies de aves en todo el mundo, con un amplio potencial de distribución donde quiera que se encuentren sus vectores (Levine, 1971, Homer y col., 2000, Ros-García y col., 2011). La babesiosis es considerada una enfermedad emergente por varios autores, por la perspectiva actual del calentamiento global y la distribución geográfica de garrapatas vectores (Mihalca y col., 2010, Dantas-Torres y col., 2012, Pfäffle y col., 2013).

La **babesiosis bovina** es una de las enfermedades más importantes en el ganado en casi todos los países en regiones climáticas tropicales y subtropicales, principalmente la causada por *B. bovis* y *B. bigemina*. Se estima que más de 1.200 millones de bovinos en el mundo están expuestos a alguna de las cuatro especies principales de babesia que han sido generalmente reconocidas en occidente, *B. bovis*, *B. bigemina*, *B. divergens* y *B. major* (Bock y col., 2004). La babesiosis es económicamente la enfermedad transmitida por artrópodos más importante del ganado a nivel mundial debido a la mortalidad, la pérdida de producción, el gasto en las medidas de control y su impacto en el comercio internacional. Así, en Estados Unidos, donde se han realizado estudios para estimar los gastos que conlleva en el sector, la babesiosis constituye una amenaza valorada en 500 millones de dólares (Uilenberg, 1995, Brown, 1997). Del mismo modo, McLeod y Kristjanson (1999) calcularon que las pérdidas de la babesiosis y la anaplasmosis, así como su control, por sí solos le costaron a la industria ganadera australiana 16,9 millones de dólares y agregaron un coste adicional de 6,4 millones de dólares anuales. Este modelo estimó además estas mismas pérdidas en Kenia, Zimbabwe, Tanzania, Sudáfrica, China, India, Indonesia y Filipinas, con costes que van desde los 0,6 millones de dólares anuales en Filipinas hasta los 57,2 millones de dólares anuales en India (McLeod y Kristjanson, 1999).

Entre las principales especies que infectan al ganado, *B. bovis*, *B. bigemina* y *B. divergens* son conocidas por su alta patogenicidad. Como se abordará más adelante en esta memoria, la reproducción asexual de estas especies de parásitos induce la destrucción masiva de los glóbulos rojos del hospedador, lo que lleva a una anemia

hemolítica intravascular grave en los animales infectados (Everitt y col., 1986). En el caso de *B. bovis*, se trata de una bacteria altamente patógena a bajos niveles de parasitemia periférica, y los animales parasitados, además de los signos clínicos relacionados con la anemia, a menudo muestran trastornos neurológicos y respiratorios, debido a la citoadherencia de los eritrocitos infectados a las células endoteliales en los lechos capilares del pulmón y del cerebro (Everitt y col., 1986, Uilenberg 1995). Las infecciones por *B. bigemina* y *B. divergens*, por otro lado, resultan en parasitemias altas y se consideran moderadamente patógenas en comparación con *B. bovis* (Uilenberg, 1995, Zintl y col., 2003). Ambas especies serán tratadas a continuación en esta revisión ya que han sido evaluadas en esta tesis doctoral.

Por otra parte, existen otras especies de babesias que infectan al ganado que se pueden clasificar como de baja patogenicidad, donde se incluyen *B. occultans*, *B. major* y *B. ovata* (Gray y De Vos, 1981, Sivakumar y col., 2016). Brevemente, *B. occultans* es una especie benigna descrita por primera vez en 1981 en los bovinos en Sudáfrica con alta prevalencia en la región (Gray y De Vos, 1981). Recientemente también se ha detectado en Túnez y en Europa, tanto en sangre de ganado vacuno, como en una garrapata del género *Hyalomma*, su vector reconocido, recogida de un animal positivo (Ros-García y col., 2011, Ros-García, García-Peréz y col., 2012). Por lo tanto, *B. occultans* tiene una distribución más amplia de la inicialmente considerada, localizándose también en regiones mediterráneas y asiáticas (Ros-García y col., 2011). *B. major* y *B. ovata* están estrechamente relacionadas y se transmiten por especies de garrapatas del género *Haemaphysalis* (Yin y col., 1996, Luo y col., 2005). *B. major* se considera la especie menos patógena, se ha identificado en Europa, en el noroeste de África y en Asia. Mientras, *B. ovata* solo se localiza en Asia y se asocia con *Theileria orientalis* en animales coinfectados por ambas especies (Bock, R. y col., 2004, Sivakumar y col., 2012, Sivakumar y col., 2016).

A continuación, nos centraremos en la revisión de *B. bigemina* y *B. divergens*, como se ha comentado previamente, que son de interés para el desarrollo de esta tesis doctoral.

#### **2.2.2.1. *Babesia bigemina***

*B. bigemina* es moderadamente patógena y se asocia principalmente con la masiva destrucción de eritrocitos, que conlleva el desarrollo de la anemia previamente mencionada, con impacto en la salud y producción del ganado vacuno, aunque menos grave para el ganado adulto, con una pequeña proporción de casos fatales (Uilenberg,



1995, Schnittger y col., 2012). La distribución geográfica de este parásito se corresponde con regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo (América, Europa, África, Asia y Australia), con la mayor incidencia entre los paralelos 40°N y los 32°S de latitud, donde comúnmente se encuentran sus vectores (Bock y col., 2004, Chauvin y col., 2009, Suarez y Noh, 2011).

En Estados Unidos había sido descrita una enfermedad semejante a la descrita por Babeş en Rumanía, que se conocía por varios nombres, como fiebre del ganado del sur, fiebre esplénica, fiebre del ganado español, moquillo del ganado de Carolina, *murrain* sanguinolenta, enfermedad del ganado mexicano, enfermedad del ganado indio, agua roja, hematuria, fiebre de garrapatas o fiebre de aclimatación, entre otros, siendo el nombre más popular el de fiebre del ganado de Texas. Smith describió en 1889 la detección del agente etiológico de la fiebre de Texas, pero no lo nombró en ese momento, y en su informe sobre observaciones preliminares, comentó unos hechos registrados por Stiles que, al parecer, podría haber sido el primero en observar el organismo 20 años antes, ya que afirmó en un informe para la Junta de Salud del Estado de Nueva York en 1867 que muchos de los glóbulos rojos observados parecían haber perdido parte de su sustancia, como si se hubiera perforado una pieza circular (Smith, 1889). Esta enfermedad, al parecer, había sido llevada a América por colonos españoles en el siglo XVI, según Archibald (1898). En 1893, Smith y Kilborne propusieron el nombre *Pyrosoma bigeminum*, más tarde *Babesia bigemina*, para el parásito norteamericano causante de la fiebre del ganado del sur o la fiebre de Texas. Además, estos autores describieron que se trataba de un protozoo redondo u ovalado que se localizaba dentro de los glóbulos rojos del ganado y que podría ser transmitido por un hospedador artrópodo intermedio (*Boophilus annulatus*), siendo este, al parecer, el primer informe de transmisión de un parásito protozoario por un artrópodo (Smith y Kilborne, 1893, Uilenberg, 2006, Ristic, 2018).

- Parasitología y epidemiología

*Babesia bigemina* es un parásito hemoprotoso que se clasifica como una babesia grande al ser los merozoítos más largos que el radio de los eritrocitos, de 4,5 a 5 µm x 2 µm. Se localiza en el interior de los eritrocitos, adquiriendo una forma piriforme, y suele presentarse en parejas formando un ángulo agudo entre los dos merozoítos, de donde procede el nombre de bigemina (Mehlhorn y Shein, 1984). También son frecuentes las formas ovales y redondeadas (Smith, 1889). Se considera una especie específica de hospedador que se multiplica exclusivamente en los eritrocitos. El crecimiento de *B. bigemina in vitro* fue descrito por primera vez por Vega

y colaboradores en 1985, resultando más difícil de cultivar que la relacionada *B. bovis* (Vega y col., 1985).

Los estudios filogenéticos basados en la comparación de secuencias del gen 18S ARNr han confirmado que *B. bigemina*, junto a *B. canis*, *B. bovis* y *B. caballi*, es monofilética y, por ello, se puede considerar una especie típica del género *Babesia* (Allsopp y col., 1994). Se han producido secuencias preliminares de alta calidad del genoma de *B. bigemina*, aunque no se ha secuenciado por completo (Marcelino y col., 2012, Jackson y col., 2014). Una estrategia utilizada para analizar la estructura poblacional de los hemoparásitos ha sido el análisis de aislamientos de campo de *B. bigemina*. Estos son genéticamente distintos, formando diferentes subpoblaciones como consecuencia de las múltiples infecciones naturales (Madruga y col., 1996). Los diferentes niveles de virulencia en el fenotipo (subpoblaciones) ejercido *in vivo* constituye una característica distintiva útil para la clasificación inicial de las cepas (Thompson y col., 2014). Sin embargo, la caracterización de las cepas se basa en estudios genéticos, para lo que se analiza, entre otros, los genes que codifican la proteína RAP-1 de las roptrias de *B. bigemina*. Esta proteína está codificada por una familia de 11 genes localizados en una sola región genómica, entre los que se incluye el gen rap-1c. Este gen es elegible para caracterizar y comparar aislados de campo de *B. bigemina* de diferentes regiones (Suarez y col., 2003, Hilpertshauser y col., 2007).

La **transmisión** de *B. bigemina* se lleva a cabo a través de especies de garrapatas del género *Rhipicephalus* (*Boophilus*). Algunas de las especies que se han descrito son *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *annulatus*, *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*, *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *decoloratus*, *Rhipicephalus* *bursa*, *Rhipicephalus* *evertsi* y *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *geigy* (Mehlhorn y Shein, 1984, Bock y col., 2004). Sin embargo, *B. (R.) annulatus* y *B. (R.) microplus*, dos especies muy similares, son los vectores más importantes y extendidos (Chauvin y col., 2009). En España, el principal vector de *B. bigemina* es *R. bursa* en la península y *B. (R.) annulatus* en las islas Baleares (Habela y col., 2002, Olmeda, Sancho y col., 2002).

*B. bigemina* se transmite durante la fase de ninfa y la etapa adulta, pudiendo permanecer en la garrapata durante más de una generación sin que sufra reinfección, gracias a que se transmite a la siguiente generación a través de los huevos (Hodgson, 1992).

Las formas infecciosas de *B. bigemina*, los esporozoítos, se inyectan en el ganado por las etapas de ninfas y adultos, ya que la hembra adulta no transmite directamente



a su descendencia el parásito, sino que transmite los quinetos transováricamente a las larvas y los esporozoítos infecciosos de las larvas tardan en aparecer unos nueve días, por lo que no se da la transmisión al hospedador vertebrado hasta la etapa siguiente (Mehlhorn y Shein, 1984, Hodgson, 1992, Bock y col., 2004). Esta transmisión transovárica es aparentemente la razón por la cual algunas especies de babesia se han extendido con éxito en todo el mundo, incluso en Europa (Schnittger y col., 2012). Además de la transmisión transovárica, también se produce una transmisión transestádica, es decir, de una etapa a otra. Los machos de *B. (R.) microplus* pueden transferirse entre el ganado que se encuentre próximo y esto puede conducir a un período prepatente más corto, de seis a 12 días, para *B. bigemina*, ya que suele ser de 12 a 18 días después de la fijación de la garrapata (Callow y Hoyte, 1961, Hodgson, 1992, Bock y col., 2004).

La inoculación de sangre de un animal portador en un receptor susceptible esplenectomizado se ha utilizado en investigación, así como para identificar infecciones latentes. Por tanto, otra posible vía de transmisión es mediante inoculación subcutánea (Böse y col., 1995, Thompson y col., 2014).

Los **reservorios** naturales se considera que son el ganado vacuno y las garrapatas que transmiten *B. bigemina*. La variación antigénica durante las infecciones por *B. bigemina* en ganado recuperado hace que la infección se mantenga latente de forma persistente, pudiendo variar la parasitemia de seis meses a varios años con momentos de parasitemia detectable que ocurren en intervalos irregulares durante esta fase latente de la infección (Bock y col., 2004, Allred y Al-Khedery, 2006, Chauvin y col., 2009).

Inicialmente se describió como un patógeno del ganado bovino, ya que los signos clínicos de la infección por *B. bigemina* están restringidos a este ganado, aunque también se ha detectado en cabras en Vietnam (Sivakumar y col., 2013). Asimismo, entre los hospedadores vertebrados parece que se ha incluido a los búfalos de agua (*Bubalus bubalis*) y a otros rumiantes silvestres (Holman y col., 2011, Terkawi y col., 2011). Se ha descrito en fauna silvestre de Norteamérica, concretamente en ciervos de cola blanca (*Odocoileus virginianus*) (Holman y col., 2011) y búfalo (Romero-Salas y col., 2016), en Europa, concretamente en corzo (*Capreolus capreolus*), ciervo rojo (*Cervus elaphus*) y jabalí (*Sus scrofa*) (Zanet y col., 2014) y en Asia, en búfalo en China (Liu y col., 1997, Terkawi y col., 2011) y yak (*Poephagus grunniens*) en India (Saud y col., 2005, Saravanan y col., 2013). Por ello se ha sugerido la existencia de un ciclo

epidemiológico común entre la vida silvestre y el ganado, siendo el ganado el reservorio reconocido de este parásito (Zanet y col., 2014).

- *Situación en España*

En España, se han hallado prevalencias de infección por *B. bigemina* en el vacuno de entre el 2,7% en el norte peninsular, el 3,6% en Toledo y del 6 al 42,4% en Menorca (Gubbels y col., 1999, Almería y col., 2001, Almería y col., 2002, García-Sanmartín y col., 2006, Almería y col., 2009, Ros-García, García-Pérez y col., 2012). Cabe destacar que se conoce muy poco sobre la prevalencia y otros aspectos epidemiológicos de las babesiosis bovinas en España, si bien se considera que *B. bigemina* es una de las babesias más importantes por su frecuencia o patogenicidad en la zona centro y sur peninsular, aunque no se descarta que se encuentre en zonas más al norte, ya que su vector en España peninsular, *R. bursa*, se halla prácticamente en todo el país, y su vector en las islas Baleares, *R. annulatus* es frecuente (Habela y col., 2002, Olmeda, Sancho y col., 2002).

- Patogenia y respuesta inmunitaria

*B. bigemina* exhibe el típico ciclo de vida de las babesias caracterizado por merogonia, gametogonia y esporogonia. Tienen una etapa sexual y una asexual dentro del vector, seguidas de una etapa asexual dentro de los eritrocitos del hospedador vertebrado, y, por tanto, su mantenimiento depende de ambos hospedadores, siendo necesario que el vector se alimente de un reservorio vertebrado que sea competente para mantener las babesias en estado infeccioso (Mehlhorn y Shein, 1984, Mackenstedt y col., 1995, Chauvin y col., 2009).

Cuando las **garrapatas** ingieren eritrocitos infectados durante la alimentación en ganado infectado, la mayoría de los parásitos se desintegran y se destruyen (Chauvin y col., 2009). Sin embargo, algunas etapas específicas del parásito, concretamente merozoitos o precursores de gametocitos, sobreviven y se someten a un desarrollo posterior para evolucionar a gametocitos o gamontes para comenzar su fase sexual, durante la cual frecuentemente ocurren eventos de recombinación (Mehlhorn y Shein, 1984, Mackenstedt y col., 1995). Así, unas horas después de la ingestión, los gamontes se diferencian a través de mecanismos indefinidos en cuerpos radiados, denominados en inglés *ray bodies*, que aparecen como cuerpos alargados con forma de punta de flecha, para hacerse competentes para la reproducción sexual (Mehlhorn y Shein, 1984). Los cuerpos radiados de *B. bigemina* son inicialmente

diploides y comienzan de inmediato con la división celular, lo que resulta en la formación de cuerpos radiados haploides o gametos (Mackenstedt y col., 1995, Gough y col., 1998). Los gametos se fusionan en la luz del tracto digestivo de la garrapata para formar el cigoto, que penetra en la célula del intestino medio mediante la invaginación de la membrana celular en el punto de contacto con el parásito gracias a la acción de la enzima liberada de una estructura en espiral del piroplásmido invasor (Gough y col., 1998). Una vez que el cigoto de la babesia se ha internalizado, el cigoto se transforma en una etapa móvil, denominada quineto (Mehlhorn y Shein, 1984). Los cigotos de *B. bigemina* se someten a una meiosis de un paso, no habiéndose detectado una replicación de ADN premeiótica. Después de completar la meiosis, el cigoto y el quineto exhiben niveles de ADN haploides. La meiosis indica el comienzo de la esporogonia (Mackenstedt y col., 1995, Mosqueda y col., 2004).

El desarrollo posterior de la babesia incluye la multiplicación asexual, que se caracteriza por la formación de una segunda generación de quinetos (esporoquinetos), produciéndose la esporogonia en diferentes órganos de la garrapata (Mehlhorn y Shein, 1984). Así, los quinetos del intestino medio escapan del epitelio y viajan a través de la hemolinfa para invadir los tejidos del cuerpo de la garrapata, incluido el ovario de las hembras. Estos quinetos que invaden las células acinares de las glándulas salivales de las garrapatas se transforman en estadios multinucleados que se desintegran para formar esporozoítos haploides (Mackenstedt y col., 1995), que representan la etapa infecciosa del parásito. Los mecanismos que conducen a la formación de esporozoítos infecciosos y su relación con los mecanismos de alimentación de garrapatas aún no se conocen bien (Suarez y Noh, 2011).

Los **hospedadores vertebrados** se infectan con la inyección de los esporozoítos con la saliva durante la picadura de la garrapata. Los esporozoítos invaden directamente los eritrocitos con la ayuda de un complejo apical especializado, donde se dividen asexualmente por fisión binaria para convertirse en merozoítos haploides, y todas las etapas parasitarias se desarrollan en el interior de los eritrocitos (Mehlhorn y Shein, 1984, Mackenstedt y col., 1995). Durante esta multiplicación asexual se han detectado variaciones genéticas (Suarez y Noh, 2011).

El parásito produce dos merozoítos por fisión binaria. La multiplicación de los merozoítos daña la membrana celular de los eritrocitos, hasta que la rompen y se liberan del eritrocito para, inmediatamente, invadir nuevos eritrocitos y producir merogonias sucesivas. La multiplicación es asincrónica y varias etapas del parásito pueden suceder en el torrente sanguíneo al mismo tiempo (Mehlhorn y Shein, 1984).

Se ha identificado un segundo tipo de merozoítos para *B. bigemina*, especie que difiere de los ciclos de vida de las otras babesias. Estos merozoítos son grandes y se consideran precursores de gamontes (Mackenstedt y col., 1995). Ambas etapas de desarrollo muestran niveles de ADN diploide, mientras que los gamontes ovoides de las otras babesias, así como los merozoitos previamente descritos para *B. bigemina*, son haploides (Mackenstedt y col., 1995).

A pesar del aclaramiento de los macrófagos y la fuerte respuesta inmunitaria frente al parásito, que será revisada posteriormente en este mismo apartado, unos pocos eritrocitos infectados permanecen en circulación en los bovinos, que se mantienen como persistentemente infectados, lo que asegura el mantenimiento de un reservorio de patógenos para su transmisión, así como la resistencia a una reinfección posterior con la misma cepa (Howell y col., 2007). La variación antigénica ocurre en ganado recuperado que mantiene una infección latente que varía de seis meses a varios años a un nivel muy bajo de parasitemia, con picos detectables que ocurren en intervalos irregulares durante la fase latente de la infección (Bock y col., 2004, Allred y Al-Khedery, 2006, Chauvin y col., 2009). Se cree que la variación antigénica, utilizada para resistir la inmunidad del hospedador, es el resultado de un polimorfismo estructural y antigénico de algunas proteínas, como VESA1 o RAP-1a de *B. bigemina*, dentro del hospedador vertebrado. Esto da como resultado múltiples proteínas con epítomos únicos para células B y T, con lo que las diversas poblaciones de parásitos continúan infectando eritrocitos, evitando así el aclaramiento esplénico y persistiendo frente a una inmunidad aparente (Suarez y col., 1998, Brown y Palmer, 1999, Jackson y col., 2014).

Además, los eritrocitos infectados con *B. bigemina* sufren modificaciones estructurales y funcionales que son dependientes del parásito. Una de estas modificaciones es la presencia de inmunoglobulinas M (IgM) en la superficie de los eritrocitos infectados que se ha detectado *in vivo* en una fase temprana de la parasitemia aguda, antes de la inducción de una respuesta inmunitaria específica (Echaide y col., 1998). La presentación de moléculas de IgM, unidas a través de la región Fc con el dominio de reconocimiento de antígeno frente al plasma, representa claramente un mecanismo con el que este parásito se oculta del reconocimiento inmunitario (Allred, 2003). Esta característica es común entre cepas de *B. bigemina*, distintas genética y antigénicamente, por lo que debe tener un papel en el crecimiento y la supervivencia (Echaide y col., 1998, Allred, 2003).

La patogenia de la infección por *B. bigemina* en el hospedador vertebrado está casi completamente relacionada con la hemólisis intravascular rápida, a veces masiva,

causada, por una parte, por la rápida reproducción del parásito, que conduce a la rotura de los eritrocitos, y, por otra, a la respuesta inmunitaria del propio hospedador, que ocurre después de la producción de anticuerpos frente a la membrana de los eritrocitos. Ambos mecanismos contribuyen a la patogenia de la anemia hemolítica, signo clínico predominante de esta babesiosis, que conduce a la hemoglobinemia y hemoglobinuria en el animal (Bock y col., 2004).

En la babesiosis bovina causada por *B. bigemina*, la resistencia adquirida pasivamente a partir del calostro se considera que dura unos nueve meses y luego disminuye gradualmente (Uilenberg, 1995). Por lo tanto, los terneros expuestos durante los primeros seis a nueve meses raramente muestran signos clínicos y desarrollan una inmunidad sólida y duradera. Sin embargo, los terneros de madres no inmunes también muestran resistencia a *B. bigemina* (Latif y col., 1979), por lo que se ha descrito una relación inversa entre la edad y la resistencia, siendo los animales jóvenes más resistentes que los adultos (Latif y col., 1979, Chauvin y col., 2009). Los animales que se infectan posteriormente, a partir de un año de edad, pueden desarrollar una enfermedad grave potencialmente mortal y, si sobreviven, llegan a convertirse en portadores con un bajo nivel de parasitemia, sirviendo como reservorios, lo que conlleva una mayor transmisión (Almería y col., 2001, Bock y col., 2004).

Los mecanismos inmunitarios desarrollados en el hospedador vertebrado para luchar contra *B. bigemina* se dirigen contra los eritrocitos infectados y contra los merozoítos libres. Ambas respuestas inmunitarias, humoral y celular, están involucradas en la inmunidad a la babesiosis (Brown y Palmer, 1999). Cuando se produce la infección por primera vez, los esporozoítos están libres en el torrente sanguíneo durante un corto período de tiempo. En esta etapa, las IgG pueden prevenir la infección uniéndose a los esporozoítos y neutralizándolos antes de que tengan éxito en la invasión de sus células diana. Sin embargo, el componente humoral se considera que tiene un limitado éxito, principalmente por ese corto intervalo de tiempo del que dispone para ser eficaz, mientras los esporozoítos permanecen fuera de la célula hospedadora (Homer y col., 2000). Algunas observaciones sugieren que *B. bigemina* puede evitar la respuesta inmunitaria humoral y manipularla en su beneficio, como se ha comentado anteriormente, gracias a la estimulación de la producción de la IgM en la superficie del eritrocito (Allred, 2003).

Cuando los organismos establecen su infección intraeritrocitaria y comienza el aumento progresivo de la parasitemia, es el sistema inmunitario innato el responsable

del control (Homer y col., 2000). En ausencia de macrófagos y células NK (*natural killer*, de sus siglas en inglés), se desarrolla una parasitemia más alta en un período de tiempo más corto (Brown y Palmer, 1999). La inhibición de la multiplicación protozoaria probablemente se logra mediante la producción de IFN- $\gamma$  por las células NK y factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), óxido nítrico (NO) y especies reactivas del oxígeno (ROS) por los macrófagos (Brown y Palmer, 1999). Sin embargo, no está claro cómo estas moléculas pueden interferir con el desarrollo del parásito dentro del eritrocito (Homer y col., 2000).

Se sabe que las células T son necesarias para la resolución de la infección por *B. bigemina* en el bovino, específicamente la subpoblación de los productores de IFN $\gamma$  CD4<sup>+</sup> (linfocitos T cooperadores, Th) (Rodríguez y col., 1996, Brown y col., 1999, Brown y col., 2001). Estas células Th producen citocinas, entre las cuales el IFN $\gamma$  parece ser de gran importancia, lo que activa las células fagocíticas y mejora la producción de IgG1 e IgG2 por las células B (Brown y col., 1998, Brown y Palmer, 1999).

- Signos clínicos y lesiones

La babesiosis bovina causada por *B. bigemina* se considera, por lo general, menos grave que la causada por *B. bovis* (Almería y col., 2001). Su patogenicidad depende de la virulencia de la cepa, entre otros factores, y se asocia principalmente con la masiva destrucción de eritrocitos que conduce a una anemia grave, con un impacto considerable en la salud y producción del ganado vacuno y que, en una pequeña proporción de casos y determinada por el grado de parasitemia, puede ser fatal (Uilenberg, 1995, Bock y col., 2004, Zintl y col., 2005, Jonsson y col., 2008).

Las manifestaciones clínicas más comunes asociadas con la infección aguda incluyen fiebre que, aunque no es muy marcada, puede provocar abortos en las hembras gestantes, anemia hemolítica, hemoglobinuria y hemoglobinemia seguidas de ictericia (Zintl y col., 2003, Zintl y col., 2005). Además, se observa anorexia y letargia a medida que la anemia avanza hasta causar anoxia anémica y puede llevar a la muerte si esta anemia se desarrolla muy rápidamente como consecuencia de la hemólisis causada por la multiplicación intraeritrocítica masiva (Zintl y col., 2005). Los signos neurológicos son poco comunes y la recuperación en casos no fatales suele ser rápida y completa (Bock y col., 2004). Las infecciones crónicas, tras la superación de la fase aguda, son normalmente asintomáticas (Schnittger y col., 2012)

La necropsia típica en casos con babesiosis revela hemólisis, con mucosas pálidas y sangre muy líquida sin coagular, hemoglobinuria y hematuria, ictericia en los casos donde se ha prolongado la enfermedad y edema pulmonar (Smith, 1889, González y Astiz, 2002). Además de estas lesiones también se observa esplenomegalia, hepatomegalia, con una coloración marrón amarillenta del hígado, junto a la vesícula biliar distendida repleta de bilis granular espesa y riñones hiperplásicos oscuros y congestionados. Otros órganos y tejidos pueden mostrar también congestión con hemorragias petequiales y equimosis (Smith, 1889).

- Hallazgos laboratoriales

Los cambios hematológicos más característicos son anemia hemolítica, macrocítica e hipocrómica, con descensos del hematocrito, del recuento eritrocitario y de la concentración de hemoglobina que, incluso, continúan disminuyendo constantemente después de la patencia en los animales que se recuperan de forma espontánea (Camacho, 2002, Bock y col., 2004). Sin embargo, la destrucción de los eritrocitos ocurre de forma distinta en función de la cepa y la presentación del cuadro clínico. La destrucción se presenta más rápidamente en casos graves y se incrementa la fragilidad osmótica de los eritrocitos durante la fase aguda en las infecciones causadas por *B. bigemina* y los niveles de hemoglobina en suero son elevados en los casos agudos (De Vos y col., 2004).

Una vez que se han eliminado los parásitos, se produce un aumento de la hematopoyesis. Sin embargo, la recuperación es lenta y pueden transcurrir varias semanas hasta que se restablezcan los recuentos normales de glóbulos rojos (De Vos y col., 2004, Aulakh y col., 2005). Inmediatamente después de la crisis hemolítica, una breve linfocitosis y monocitosis se combinan para causar una leucocitosis, aunque los cambios en la serie blanca son variables, pudiendo presentarse también neutrofilia y linfopenia (Camacho, 2002, Aulakh y col., 2005, Salem y col., 2016). Por lo que respecta a las plaquetas, suele darse trombocitopenia en los casos en los que se desarrolla una coagulación intravascular diseminada (Camacho, 2002).

Los cambios bioquímicos descritos en la bibliografía reflejan las consecuencias del estasis circulatorio y la hipotensión, que incluyen daño hepático y renal, por lo que entre los hallazgos bioquímicos más habituales se encuentran las enzimas hepáticas aumentadas, al igual que la urea y la creatinina (Camacho, 2002, Aulakh y col., 2005, Sharma y col., 2016). Además, en los casos con afectación renal importante, se observa una disminución de las proteínas totales y una disminución de la albúmina que se



asocia a la fase aguda de muchas enfermedades infecciosas a causa de su pérdida urinaria junto con la disminución de su síntesis en el hígado (Camacho, 2002, Salem y col., 2016). En el urianálisis es frecuente encontrar hemoglobinuria y proteinuria, sobre todo en la fase aguda (Camacho, 2002, Salem y col., 2016).

- Diagnóstico

La microscopía óptica a menudo se usa para detectar infección aguda, y se basa generalmente en la detección del protozoo en el interior de los hematíes gracias a la extensión de sangre periférica teñida con Giemsa u otras tinciones habituales para hematología, junto con los signos clínicos de la enfermedad (Almería y col., 2001). Los frotis de sangre ofrecen ventajas en cuanto al coste y rapidez de obtención de resultados para los casos clínicos, si se dispone de personal con experiencia (Mosqueda y col., 2012). Sin embargo, no es posible realizar una diferenciación morfológica de las especies de babesia, ni discriminar las especies patógenas de las no patógenas, que, además, pueden ocurrir simultáneamente en el mismo hospedador (Almería y col., 2001). Además, los animales portadores presentan un bajo número de eritrocitos infectados, haciéndose necesario un concienzudo examen para encontrar los organismos, por lo que la baja sensibilidad de este método no permite su uso en estudios epidemiológicos, donde es necesario identificar animales portadores, importantes contribuyentes para la transmisión de la infección a otros animales sanos susceptibles en el rebaño y a las garrapatas, y por tanto, para controlar la infección (Almería y col., 2001, García-Sanmartín y col., 2006).

Los métodos moleculares permiten un diagnóstico más específico y sensible comparado con las técnicas parasitológicas convencionales comúnmente utilizadas para *B. bigemina*, incluso con bajos niveles de parasitemia, como en infecciones subclínicas y latentes, pudiendo ser interesante para el estudio de los animales portadores o para la evaluación de tratamientos y medidas de control (García-Sanmartín y col., 2006). Por tanto, la identificación definitiva de la especie de babesia implicada requiere de la aplicación de técnicas de detección molecular. Las primeras descripciones de empleo de PCR para detectar *B. bigemina* se publicaron en 1992 y, desde entonces, se han realizado numerosos estudios empleando diferentes técnicas de PCR (Figuerola y col., 1992, Suarez y col., 2003, Mosqueda y col., 2012, Ros-García, Nicolás y col., 2012, Sharma y col., 2013). También se han empleado la combinación de PCR con hibridación específica con RLB (Gubbels y col., 1999, García-Sanmartín y col., 2006) o Luminex®, que implica la amplificación por PCR de un segmento de la subunidad 18S del ARNr de todas las especies de babesia y la posterior hibridación de



los amplicones con oligonucleótidos específicos de especie para identificar simultáneamente las diferentes especies presentes en muestras individuales de animales, incluso portadores (Ros-García, Juste y col., 2012). Esta técnica logra un aumento de la sensibilidad y la especificidad (Ros-García, García-Pérez y col., 2012, Ros-García, Juste y col., 2012).

Alternativamente, se pueden aplicar métodos de diagnóstico serológico, como IFI y ELISA, para detectar anticuerpos específicos frente a estos parásitos (Burridge y col., 1973, Passos y col., 1998). Sin embargo, la presencia de anticuerpos son un signo de exposición previa al agente, no correspondiendo necesariamente con el estado infeccioso actual, ya que en la infección por *B. bigemina* los anticuerpos tienden a desaparecer en los portadores a largo plazo, mientras que los protozoos persisten (García-Sanmartín y col., 2006), o bien la parasitación puede haber sido controlada y mantenerse anticuerpos que puedan ser detectados por estas técnicas (Callow, 1967). Por lo tanto, los animales con una prueba serológica negativa aún pueden ser portadores (García-Sanmartín y col., 2006) y los seropositivos pueden no estar parasitados (Mosqueda y col., 2012). Otros inconvenientes de los métodos de serología son que no se pueden aplicar a terneros jóvenes, debido a la posible interferencia con anticuerpos del calostro (Wright, 1990), y que la especificidad es inferior a la del diagnóstico molecular, ya que frecuentemente se producen reacciones cruzadas con anticuerpos entre diferentes especies de babesia (Papadopoulos y col., 1996, Figueroa y col., 2006). Así, en 1995, Böse y colaboradores, en una revisión del diagnóstico de babesias recomendaron no usar las pruebas serológicas existentes para *B. bigemina* por tener baja sensibilidad y especificidad (Böse y col., 1995). No obstante, en 2008, se publicó la validación para uso internacional de un cELISA basado en un epítipo de células B específico de especie ampliamente conservado dentro del C terminal de la proteína rap-1a de *B. bigemina*, con una especificidad del 98,3-100% y una sensibilidad del 94,7-87,2%, dependiendo del umbral para un resultado negativo, y fue capaz de detectar anticuerpos en suero siete días después de la inoculación intravenosa (Goff y col., 2008).

#### ○ Tratamiento

Actualmente, el dipropionato de imidocarb y el aceturato de diminazeno son los fármacos más ampliamente utilizados en el tratamiento de la babesiosis bovina causada por *B. bigemina* (Bock y col., 2004).

El dipropionato de imidocarb es un derivado de carbanilida con actividad antiprotozoaria que, por lo general, se administra como sal de dipropionato o sal de dihidrocloruro y es el principio babesicida de elección para la babesiosis causada por *B. bigemina*. Se ha utilizado durante las dos últimas décadas, tanto para el tratamiento, a una dosis de 1,2 mg/kg, como para la protección a corto plazo, tal y como se comentará más adelante (Bock y col., 2004). A altas dosis, el imidocarb también elimina *B. bigemina* de los animales portadores (Bock y col., 2004). A pesar de esto, el imidocarb se asocia con problemas de residuos en la carne y la leche durante largos periodos después del tratamiento, ya que se retiene en los tejidos comestibles (Gohil y col., 2013, Mosqueda y col., 2012).

El aceturato de diminazeno es una diamidina aromática que se comercializa como una sal de diaceturato. Es el agente anti-tripanosómico más utilizado y también se ha utilizado en el tratamiento de la babesiosis bovina, siendo efectivo contra *B. bigemina* y protegiendo al ganado hasta cuatro semanas. Por lo general, se administra mediante inyección intramuscular a dosis de 3-5 mg/kg (Bock y col., 2004, Mosqueda y col., 2012).

El tratamiento con oxitetraciclina de acción prolongada no es capaz de controlar infecciones naturales del bovino por *B. bigemina*. Sin embargo, se utiliza como profilaxis, tal y como se describirá en el apartado de Control y Prevención de esta babesiosis (Jorgensen y col., 1993, Olmeda, Valcárcel y col., 2002, Bock y col., 2004).

Es evidente que sería altamente deseable el desarrollo de nuevas terapias específicas contra los parásitos del género *Babesia*, que a la vez muestren bajas toxicidades contra el hospedador. En este sentido, recientemente se han revisado nuevos agentes quimioterapéuticos que se encuentran en desarrollo. Entre ellos, el triclosan es un compuesto clorado aromático que tiene un efecto inhibitor sobre el crecimiento de *B. bigemina*, al menos en estudios *in vitro*, a una concentración de triclosán de 100 µg/ml y, además, parece ser capaz de prevenir el nuevo crecimiento del parásito en subcultivos posteriores, afectándose aparentemente todas las etapas del parásito. Además, no se encontró toxicidad contra las células hospedador después de la adición de triclosán (Mosqueda y col., 2012).

Asimismo, el nerolidol, un sesquiterpeno presente en aceites esenciales de varias plantas y usado como saborizante, ha demostrado *in vitro* que es capaz de inhibir el crecimiento de *B. bigemina* a 10 µM y el crecimiento del parásito está completamente suprimido a 50 µM (Mosqueda y col., 2012).

Finalmente, la epoxomicina ha demostrado efectos inhibitorios sobre el crecimiento *in vitro* de *B. bigemina* con un tratamiento con una concentración de 5 nM. Además, las combinaciones de epoxomicina con aceturato de diminazeno potenciaron su efecto inhibitor en cultivos celulares *in vitro*, pero se requieren estudios adicionales (Mosqueda y col., 2012).

- Control y prevención

Las babesiosis siguen siendo altamente prevalentes en todo el mundo, en parte debido a que el enfoque actual para su control tiene muchas limitaciones y debe mejorarse. Entre los factores más importantes que afectan a la epidemiología de la babesiosis bovina que deben ser tenidos en cuenta se incluye una mayor resistencia a los acaricidas por las garrapatas (Jonsson y col., 2008). Así, se indica que el control del vector mediante el uso de ectoparasiticidas debe aplicarse adaptándose a la garrapata de la zona para optimizar su eficacia, ya que un uso continuado de estos productos químicos es costoso, difícil de mantener y se presenta el riesgo de la posible aparición de poblaciones de garrapatas resistentes a estos productos (Olmeda, Valcárcel y col., 2002). Por ello, se siguen realizando intentos para desarrollar la identificación y caracterización de nuevos antígenos candidatos a vacunas contra garrapatas que sean eficaces no solo contra las infestaciones, sino también a la infección y transmisión de patógenos en el ganado (de la Fuente, Kopacek y col., 2016).

Las estrategias de control exitosas contra *B. bigemina* deben incluir un diagnóstico preciso que pueda detectar la infección en una fase temprana y en los animales portadores y que pueda diferenciar de manera fiable entre las cepas vacunales de *B. bigemina* y los aislados de campo (Molad y col., 2015). Así, el desarrollo de vacunas contra la babesiosis bovina debe considerarse una prioridad. Esto, sin embargo, ha sido difícil debido a la complejidad y el desconocimiento de la biología de los parásitos, así como a la naturaleza de las respuestas inmunitarias (Suarez y Noh, 2011). Australia produce una vacuna atenuada trivalente refrigerada o congelada que ofrece protección contra *B. bovis*, *B. bigemina* y *A. marginale*. En Australia, Sudáfrica, Argentina, Brasil, Uruguay e Israel se utilizan estas vacunas vivas realizadas por pases seriados contra *B. bigemina* y se ha demostrado su eficacia en países donde el vector es endémico (de Castro, 1997, Bock y de Vos, 2001). Sin embargo, debido a que la vacuna se deriva de la sangre de terneros infectados con una cepa de laboratorio de *B. bigemina*, existe la posibilidad de contaminación con otros organismos patógenos (De Vos, 1991). Se ha sugerido que el cultivo *in vitro* puede usarse como fuente de parásitos para minimizar el riesgo de contaminación asociada con el uso de animales donantes

en la producción de vacunas (De Vos, 1991, Jorgensen y col., 1992). Si bien estas vacunas vivas atenuadas son altamente efectivas, se recomienda su uso en ganado joven, entre los tres y nueve meses de edad, ya que proporcionan una protección sólida superior al 95%, pero presentan limitaciones, que incluyen una corta vida útil, el requerimiento de una cadena de frío, y la aparición de brotes con cepas heterólogas que son genéticamente distintas de la cepa vacunal, así como la posible transmisión de la cepa vacunal por las garrapatas (Wright, 1990, Bock y De Vos, 2001, Suarez y Noh, 2011, Gohil y col., 2013).

Actualmente, los esfuerzos se dirigen hacia el desarrollo de vacunas recombinantes y de subunidades. La búsqueda de antígenos candidatos se ha centrado principalmente en los antígenos de superficie de merozoitos, como RAP-1, que son funcionalmente relevantes e inmunodominantes en el ganado inmune natural, así como en las cepas conservadas y, además, solventaría las desventajas prácticas del uso de las vacunas atenuadas. Sin embargo, en el caso de las babesias, este tipo de vacunas no confieren el nivel o la duración de la protección cruzada contra cepas de campo proporcionada por las vacunas vivas. En cualquier caso, no se encuentran disponibles este tipo de vacunas y parece ser que es poco probable que estén disponible en el futuro cercano (Bock y col., 2004).

Otra estrategia descrita en la prevención y control de la parasitosis del ganado por *B. bigemina* es el uso como profiláctico de algunos de los fármacos empleados en el tratamiento de la enfermedad. En concreto, se ha descrito el empleo de dipropionato de imidocarb para la protección a corto plazo, administrándolo al doble de su dosis terapéutica (a 3 mg/kg), por inyección subcutánea o intramuscular, pudiendo proporcionar protección contra *B. bigemina* durante, al menos, dos meses (Bock y col., 2004, Mosqueda y col., 2012). También se ha descrito el uso de oxitetraciclina de acción prolongada al introducir animales susceptibles o simultáneamente a la vacunación, ya que reduce significativamente la parasitemia y la destrucción de glóbulos rojos, sin inhibir el desarrollo de la inmunidad (Jorgensen y col., 1993, Olmeda, Valcárcel y col., 2002, Bock y col., 2004).

#### **2.2.2.2. *Babesia divergens***

Las infecciones por *B. divergens* pueden tomar un curso leve, grave o fatal, siendo las infecciones subclínicas bastante comunes (Zintl y col., 2003). Se trata de una zoonosis importante, hecho que no es frecuente en el género *Babesia* (Mackenstedt y col., 1995), y su presencia se ha confirmado en toda Europa, incluyendo Irlanda,

Escocia y el oeste de Inglaterra, afectando principalmente al ganado desde Escandinavia hasta el Mediterráneo y llegando hasta el norte de África (Bouattour y Darghouth, 1996, Zintl y col., 2003, Schnittger y col., 2012). *B. divergens* es una de las especies más comunes de babesia que infectan al ganado, especialmente en los países más fríos, aunque la incidencia de la enfermedad parece haber ido disminuyendo a pesar de que su vector principal, *Ixodes ricinus*, está extendiendo su rango (Hornok y col., 2006, Zintl y col., 2014).

Las estimaciones de los costos anuales asociados con la infección por *B. divergens* en la República de Irlanda se acercan a los 15 millones de dólares cuando las pérdidas de producción y muerte se añaden a los costes del tratamiento (Ristic, 2018). En el norte de Irlanda, se han realizado estimaciones de pérdidas animales cercanas a los 320.000 dólares. Las pérdidas anuales en Inglaterra y Escocia fueron de 450.000 dólares, pero son datos basados en estimaciones de 1974 (Ristic, 2018).

*B. divergens* fue descrita por primera vez por M'Fadyean y Stockman en el Reino Unido, quienes lo llamaron *Piroplasma divergens* (M'Fadyean y Stockman, 1911). Se ha prestado relativamente poca atención a este agente, por lo que su importancia para la industria ganadera actual en Europa casi con toda seguridad se subestimada, así como su importancia médica humana, ya que parece ser la única especie zoonótica confirmada de babesia en Europa. Aunque las infecciones humanas son infrecuentes, son fatales en personas esplenectomizadas, a menos que sean tratadas inmediatamente (Zintl y col., 2003). A pesar de ser una de las babesias bovinas más comunes y la que se ha considerado de mayor importancia en Europa, es de la que menos información hay disponible, probablemente por su menor patogenicidad en comparación con *B. bovis* o *B. bigemina*.

- Parasitología y epidemiología

*B. divergens* se clasifica morfológicamente como una babesia pequeña, ya que los merozoitos son más pequeños que el radio de los eritrocitos en los que se aloja, 1,5 x 0,5  $\mu\text{m}$ . Se ubica en la periferia celular, donde pueden causar ligeras protuberancias de la membrana de los eritrocitos bovinos. No se divide simultáneamente, por lo que todas sus etapas divisionales se pueden observar en un mismo frotis (Mehlhorn y Shein, 1984, Gorenflot y col., 1991). Morfológicamente presenta una amplia diversidad que cambia en función del hospedador en el que se encuentre. En el ganado bovino, puede adquirir diferentes formas: de anillo redondo u ovalado; de pera, presentándose solos o en pares, con un ángulo muy abierto con apariencia divergente, a la que el

parásito debe su nombre; y con formas filamentosas o amorfas en momentos de parasitemia alta (Mehlhorn y Shein, 1984, Gorenflot y col., 1991).

De forma similar al amplio rango de hospedadores que es capaz de infectar en la naturaleza, como veremos a continuación, pronto se observó que *B. divergens* exhibe baja especificidad de hospedador *in vitro*, pudiendo ser cultivada no solo en eritrocitos bovinos durante un largo plazo, sino también en eritrocitos de otras especies, como humano, jerbo, rata y oveja, en un sistema de fase estacionaria microaerófila (MASP), que posteriormente pasó a un protocolo de cultivo basado en un medio sintético basal con el que se obtuvo un mejor porcentaje promedio de eritrocitos parasitados (Gorenflot y col., 1991, Valentin y col., 1993, Grande y col., 1997, Chauvin y col., 2002). Por el contrario, los intentos iniciales para establecer infecciones con fines diagnósticos en animales de laboratorio, como conejos, ratones, hámsters y ratas, no tuvieron éxito. El único animal de laboratorio que se ha encontrado que es completamente susceptible, ya sea intacto o esplenectomizado, es el jerbo mongol (*Meriones unguiculatus*) (Zintl y col., 2003), por lo que *B. divergens* es la única especie bovina de babesia que puede transferirse de ganado infectado a jerbos, se mantiene en jerbos y posteriormente se transfiere de jerbos al ganado (Bouattour y Darghouth, 1996).

Genéticamente se clasifica con las babesias grandes, a diferencia de su clasificación morfológica, y *B. divergens* se considera que está estrechamente relacionada con *B. bigemina* (Schnittger y col., 2012, Jackson y col., 2014).

Aunque no se ha completado la secuencia genómica de esta babesia, sí se ha secuenciado un genoma preliminar de alta calidad del aislado humano de *B. divergens* cepa Rouen 1987, a partir de cultivos de eritrocitos humanos, con un tamaño aproximado de 10,8 Mpb y un contenido de GC del 40%, así como el genoma de la cepa de *B. divergens* 1802 A, que se obtuvo infectando un jerbo con sangre de vaca, con un tamaño de 9,58 Mpb y un 42% de GC (Cuesta y col., 2014, Jackson y col., 2014). La cepa conocida como *B. divergens* Purnell es el aislado de tipo bovino que se considera como la especie tipo a partir de la cual se comparan otras cepas, las cuales se definen en base a su origen geográfico gracias al polimorfismo genético entre aislados de la proteína Bd37 (Gray, 2004, Hadj-Kaddour y col., 2007).

*B. divergens* se **transmite** casi exclusivamente por *Ixodes ricinus*, aunque también aparece en la bibliografía la posible transmisión por *Ixodes persulcatus* (Mehlhorn y Shein, 1984, Bock y col., 2004). Esto probablemente explica su distribución limitada en zonas donde las condiciones climatológicas sean favorables al

vector (Gray, 2004). En un estudio de prevalencia de piroplasmas en garrapatas llevado a cabo en el País Vasco, se detectaron dos garrapatas (2/97) de la especie *Dermacentor reticulatus* con ADN de *B. divergens*, una especie no descrita como vector (García-Sanmartín y col., 2008).

Las observaciones de campo sugieren que el ganado es más fácilmente parasitado por garrapatas adultas, pero todas las etapas son infecciosas, mientras que solamente las hembras adultas pueden adquirir la infección del hospedador (Gray, 2004), mientras que en experimentos *in vitro* larvas y ninfas también pudieron adquirir la infección (Bonnet y col., 2007).

En el caso de *B. divergens*, parece que el hospedador vertebrado no es esencial a corto plazo para mantener el ciclo del parásito, llegando a persistir en las garrapatas incluso en larvas de segunda generación en ausencia de hospedadores susceptibles, debido a que la infección persiste a través de mudas, con una transmisión transestadica, y se transmite también por vía transovárica (Zintl y col., 2003, Bonnet y col., 2007). En condiciones de campo, *I. ricinus* requiere alrededor de tres años para completar una generación. Esto significa que la infección puede retenerse en la población de garrapatas durante al menos cuatro años incluso en ausencia de un hospedador bovino (Donnelly y Peirce, 1975, Zintl y col., 2003). Sin embargo, es posible que las garrapatas tengan un mecanismo de resistencia contra *B. divergens*, ya que no todas las hembras que se alimentan de un bovino infectado se infectan, así como la progenie de una hembra infectada puede no infectarse (Donnelly y Peirce, 1975, Zintl y col., 2003).

El parásito también se mantiene en el medio gracias al ganado persistentemente infectado, con parasitemias que pueden permanecer durante varios años después de la infección inicial (Joyner y Davies, 1967, L'Hostis y Chauvin, 1999, Zintl y col., 2003).

La infección por transfusión de sangre también es posible, ya que los eritrocitos infectados son vehículos óptimos para el parásito, asegurando su replicación continua (Cursino-Santos y col., 2014). Además, se ha descrito que puede transmitirse transplacentariamente (Egeli, 1996).

Se ha detectado *B. divergens* en garrapatas recolectadas de aves migratorias, que son potencialmente importantes para la dispersión de los patógenos. Por tanto, se sugiere que las aves tienen un papel en los ciclos dispersión e infección en Europa (Hildebrandt y col., 2010).



Este agente revela características especiales en cuanto a la variedad de **hospedadores** que es capaz de infectar, entre los que se incluyen además del ganado, los humanos y los jerbos, hecho que no es frecuente en el género *Babesia* (Mackenstedt y col., 1995) y que caracteriza a *B. divergens* (Bouattour y Darghouth, 1996). Como hemos visto, las garrapatas son, sin duda, el principal reservorio no bovino más importante.

En cuanto a los **hospedadores vertebrados no bovinos** de esta especie, parece poco probable que representen reservorios significativos. Esta babesia ha sido capaz de infectar de forma experimental a ungulados silvestres esplenectomizados (como corzo, gamo, ciervo y muflón) (Zintl y col., 2003, Chauvin y col., 2009) y, aunque en un principio las ovejas esplenectomizadas parecían ser completamente resistentes a *B. divergens*, investigaciones posteriores han logrado producir parasitemias, aunque muy bajas, en ellas (Chauvin y col., 2002). Mientras, en la inoculación en renos intactos, los animales mostraron signos clínicos leves y su sangre resultó ser infecciosa para el ganado susceptible, aunque parecen sufrir solo infecciones muy leves con parasitemias bajas (Nilsson y col., 1965).

También se han detectado infecciones adquiridas de forma natural en corzos, para los que se ha sugerido que podrían ser portadores asintomáticos, y en renos y ciervos (Langton y col., 2003, Duh y col., 2005), por lo que estos animales pueden contribuir al mantenimiento y la propagación de los vectores infectados (Schnittger y col., 2012).

Como veremos posteriormente en el apartado de consideraciones de salud pública, la babesiosis causada por *B. divergens* en humanos es poco común y, sin embargo, estas infecciones se describen cada vez más en pacientes inmunocomprometidos o esplenectomizados, en los que a menudo causa la muerte (Vannier y Krause, 2012).

#### ▪ Situación en España

En España, mediante serología se determinó una prevalencia del 33,7% en ganado bovino de Galicia (Pallas, 1999).

En cuanto a la prevalencia molecular en nuestro país, *B. divergens* se ha detectado en un 1,1% de bovinos procedentes de granjas ubicadas, la mayoría de ellas, en la mitad norte peninsular, y en un 6% en estudios realizados en Menorca (García-Sanmartín y col., 2006, Ros-García, García-Pérez y col., 2012), si bien debe destacarse



que no se había detectado en estudios previos realizados en Menorca, Toledo y Cádiz (Gubbels y col., 1999, Almería y col., 2002).

Además, en España también se ha amplificado ADN de *B. divergens* en corzos (8,7%, 6/69) en el País Vasco (García-Sanmartín y col., 2007).

- Patogenia y respuesta inmunitaria

Del mismo modo que se describió para *B. bigemina*, *B. divergens* se desarrolla siguiendo el típico ciclo de vida de las babesias, con una reproducción sexual y una asexual dentro de la garrapata y una etapa asexual dentro de los eritrocitos del hospedador vertebrado. Por tanto, este ciclo es básicamente similar al descrito para *B. bigemina*, si bien muestran algunas diferencias, en relación con la meiosis de los quinetos y en relación al desarrollo de los gametos o gamontes, que se detallarán a continuación.

La reproducción sexual (gametogonia) ocurre en la **garrapata** después de que los gamontes haploides hayan sido captados durante la ingestión de sangre del hospedador vertebrado. Los gamontes se transforman directamente en cuerpos radiados haploides, a diferencia de lo que ocurre con *B. bigemina*, especie en la que son inicialmente diploides, dentro del intestino, donde se fusionan, dando lugar a un cigoto esférico inmóvil, sin evidencia de meiosis pre o postcigótica, que se diferencia en quinetos poliploides móviles. Estos quinetos entran en la hemolinfa y se diseminan a través de varios tejidos, incluyendo los ovarios (Mehlhorn y Shein, 1984, Mackenstedt y col., 1990).

En las glándulas salivales se produce uno o dos ciclos de reproducción asexual (esporogonia), lo que resulta en un gran número de quinetos en estadio multinucleado. Una vez que la garrapata comienza a alimentarse de un nuevo hospedador, los quinetos que han ingresado a las células salivales de las garrapatas se convierten en numerosos esporozoítos haploides, que se inoculan durante la segunda mitad del ciclo (Donnelly y Peirce, 1975, Zintl y col., 2003).

Los esporozoítos invaden los eritrocitos directamente, sin evidencia directa de una etapa preeritrocítica (Mackenstedt y col., 1990). Al principio, una vacuola parasitófora rodea al esporozoíto y, a medida que la membrana de la vacuola se desintegra, el parásito alcanza rápidamente el citoplasma del eritrocito, limitado por

una única membrana plasmática que está directamente en contacto con el citoplasma (Gorenflot y col., 1991). En esta etapa, denominada en ocasiones “etapa de alimentación”, el parásito se considera un trofozoíto haploide (Zintl y col., 2003). A continuación, se produce una replicación del ADN, dando lugar a una fase anular binucleada, y se divide asexualmente por fisión binaria en dos merozoítos haploides, que escapan del eritrocito, al lisar la célula para invadir otras nuevas (Mackenstedt y col., 1990).

Así, un merozoíto libre se fija a la célula hospedadora, orienta el extremo apical hacia la superficie celular y libera unos productos secretorios de las roptrias para que la membrana de los eritrocitos se invagine. La capa superficial que cubre el merozoíto libre se elimina durante el proceso de invasión. La gran mayoría de los merozoítos continúan multiplicándose asexualmente, mientras que una pequeña proporción se convierte en gamontes esféricos no divisorios, que permanecen dentro de los eritrocitos hasta que son captados por las garrapatas durante la alimentación (Mehlhorn y Shein, 1984, Mackenstedt y col., 1990, Skuce y col., 1996, Zintl y col., 2003). Estos gamontes esféricos no divisorios son haploides, a diferencia de los encontrados en el ciclo de *B. bigemina*, que eran diploides y se consideraban precursores de gamontes (Mackenstedt y col., 1995).

Mientras tanto, la parasitemia va aumentando hasta llegar al 30-45%, lo que causa una destrucción extensa de eritrocitos. La hemoglobinuria resultante, con frecuencia el primer signo detectado, se produce en el pico de la crisis hemolítica y puede manifestarse en parasitemias tan bajas como del 3% (Zintl y col., 2003, Gray, 2004).

El parásito se mantiene en el animal que se ha recuperado de infecciones previas o que tiene infecciones subclínicas leves. Estas parasitemias pueden persistir durante varios años después de la infección inicial (Joyner y Davies, 1967) y pasar desapercibidas, sirviendo como fuente de parásitos para la infección de nuevas garrapatas (Donnelly y Peirce, 1975).

Las babesias intraeritrocíticas están parcialmente protegidas de la **respuesta inmunitaria** del hospedador, mientras que los merozoitos libres están expuestos hasta que invaden un nuevo eritrocito. La superficie del merozoito está recubierta de un exoantígeno (Bd37) anclado en su membrana que está involucrado en la unión a la superficie del eritrocito del hospedador y, a su vez, es un objetivo inmunodominante para los anticuerpos protectores del hospedador (Precigout y col., 2004, Hadj-Kaddour y col., 2007). Sin embargo, al igual que para muchas otras especies capaces de causar

infecciones persistentes, en *B. divergens* se encuentran genes que codifican proteínas (en este caso en concreto, proteínas VESA, variación antigénica de la superficie del eritrocito o *variant erythrocyte surface antigen*), implicadas en la variación antigénica. Así, estas proteínas expuestas a la superficie exhiben un alto grado de polimorfismo antigénico que le permite al parásito evadir el sistema inmunitario del hospedador como una estrategia de supervivencia (Carcy y col., 2006, Jackson y col., 2014).

Los terneros de hasta un año de edad son tan susceptibles como el ganado adulto a la infección por *B. divergens*, pero es menos probable que aparezcan signos clínicos. Este fenómeno es conocido como resistencia inversa a la edad y también se puede observar, aunque en menor grado, en animales de hasta dos años y medio de edad (Christensson, 1989). Esta resistencia se debe a la inmunidad innata de los terneros y es independiente del estado inmune materno, aunque las crías de las madres resistentes adquieren anticuerpos específicos (principalmente IgG) a través del calostro. Si bien, estas inmunoglobulinas calostrales no parecen ser necesarias para la protección, porque los terneros de las madres susceptibles sin anticuerpos específicos son igualmente resistentes (Christensson y Moren, 1987). Por el contrario, los terneros esplenectomizados se vuelven completamente susceptibles a la enfermedad, lo que sugiere que en la protección del hospedador vertebrado está involucrada la inmunidad innata no específica mediada por células, concretamente macrófagos y células NK, que degradan los parásitos intraeritrocíticos al liberar mediadores solubles (Zintl y col., 2005). Los animales que se recuperan de infecciones por *B. divergens* generalmente desarrollan inmunidad específica que no dura indefinidamente y, en ausencia de exposición a la reinfección, el animal se vuelve susceptible (Zintl y col., 2003).

Los mecanismos inmunitarios adaptativos incluyen componentes celulares y humorales. Se cree que los monocitos y los linfocitos son los principales agentes de la inmunidad adquirida mediada por células (Valentin y col., 1993). En general, el papel protector de los anticuerpos en *B. divergens* es poco conocido y se considera que tiene poca importancia, por no tener un efecto inhibitorio sobre la multiplicación del parásito (Zintl y col., 2003). La producción de los anticuerpos se inicia entre el sexto y décimo día después de la infección y persiste durante varios meses (Gorenflot y col., 1991, Valentin y col., 1993). Durante las infecciones secundarias, la protección parece depender de la alta especificidad de los anticuerpos, más que del nivel total de anticuerpos anti-*B. divergens*, ya que los animales resistentes frecuentemente tienen niveles muy bajos de anticuerpos específicos (Gorenflot y col., 1991).

---

- Signos clínicos y lesiones

En el caso de la babesiosis causada por *B. divergens*, los signos clínicos que pueden observarse varían desde la existencia de una enfermedad subclínica al desarrollo de una enfermedad aguda. La gravedad de la enfermedad y el curso de la misma está determinada por: el grado de parasitemia, habiéndose determinado que la dosis infecciosa mínima requerida para producir signos clínicos es de  $10^3$  parásitos inoculados por vía intravenosa; el número de garrapatas infectadas que se alimentan de un animal; el estado inmunitario del hospedador; y la virulencia de la cepa infectante (Purnell y col., 1977, Zintl y col., 2003).

Las infecciones subclínicas son bastante comunes y generalmente pasan desapercibidas. Los animales afectados por la enfermedad clínica frecuentemente tienen baja parasitemia y presentan signos como fiebre y anorexia leves que pasan desapercibidos, recuperándose sin tratamiento (Zintl y col., 2003). Sin embargo, los casos más graves presentan fiebre de inicio agudo (hasta 41°C), mucosas pálidas, que pueden llegar a estar ictéricas, anorexia y, a medida que la anemia avanza, el animal se deprime más, llevándolo a un estado de debilidad (Zintl y col., 2003, Gray, 2004). También se presenta un aumento en la frecuencia respiratoria y la frecuencia cardíaca y, entre los signos digestivos, se encuentra el cese de la rumia y diarrea que es reemplazada por el estreñimiento (Gray, 2004).

Mientras tanto, la parasitemia puede aumentar hasta afectar al 30-45% de los eritrocitos, causando una destrucción extensa de hematíes que lleva a la presentación de hemoglobinuria y hemoglobinemia durante un pico de la crisis hemolítica (Zintl y col., 2003). La anoxia cerebral resultante de la anemia grave puede causar cambios de comportamiento (Zintl y col., 2003).

La muerte generalmente se atribuye a insuficiencia cardíaca o insuficiencia hepática y renal (Zintl y col., 2003). La tasa de letalidad se ha estimado que puede rondar el 10%, si bien está influida por la velocidad del diagnóstico y el tratamiento (Zintl y col., 2003). Aunque sea una especie patógena, las formas clínicas no son tan graves como las causadas por *B. bigemina* y *B. bovis*, pudiendo haber animales que se recuperan de forma espontánea (Zintl y col., 2003, Gray, 2004).

En el examen *post mortem* se revela la presencia de mucosas y órganos pálidos y, en los casos más graves, ictericia marcada, hígado y riñón agrandados y oscurecidos, pudiendo haber indicios de degeneración hepatocelular y necrosis, así como esplenomegalia con congestión y consistencia pulposa con depósitos de hemosiderina,

que, además, pueden encontrarse en otros órganos (Egeli, 1996, Zintl y col., 2003). Pueden existir hemorragias equimóticas en epicardio y el endocardio, y el saco pericárdico puede contener una gran cantidad de líquido sanguinolento. También puede encontrarse edema en los lóbulos pulmonares apical y cardiaco y los nódulos linfáticos pueden observarse aumentados de tamaño (Egeli, 1996, Zintl y col., 2003).

- Hallazgos laboratoriales

Los animales infectados con *B. divergens* muestran una disminución en el recuento de eritrocitos, el hematocrito y el nivel de hemoglobina hasta que se eliminan los parásitos, incluso en los animales que se recuperan de forma espontánea (Purnell y col., 1977). Luego se produce un aumento en la hemopoyesis, que se evidencia en el frotis de sangre teñida por la presencia de eritrocitos nucleados, policromasia y anisocitosis (Purnell y col., 1977).

Inmediatamente después de la patencia, aparece una breve pero marcada linfocitosis que causa una leucocitosis, que se acompaña frecuentemente por una neutropenia y una monocitosis (Purnell y col., 1977, Valentin y col., 1993).

Los cambios en el suero pueden incluir aumento de potasio y niveles reducidos de calcio y sodio. El contenido de hierro en suero puede variar, con niveles bajos a niveles normales en algunos animales y concentraciones muy altas de hierro sérico en otros (Zintl y col., 2003).

- Diagnóstico

Los casos de *B. divergens* generalmente se pueden diagnosticar por los signos clínicos, la temporada epidemiológica, las circunstancias del rebaño y la granja, así como por su historial, confirmándose al examinar los frotis de sangre teñidos con tinciones habituales para hematología, en los que los parásitos pueden ser detectados a partir del día diez postinfección (Holman y col., 2005). Tal y como se mencionó previamente, *B. divergens* adquiere formas variables en el interior de los hematíes del bovino infectado, por lo que puede ser confundido con otras basesias (Gorenflot y col., 1991).

Como para muchas otras enfermedades infecciosas, las técnicas de biología molecular han demostrado ser útiles para la detección rápida, específica y sensible del ADN del parásito, con el principal objetivo de la búsqueda de portadores (Cacciò y col.,

2000). En el caso de *B. divergens*, los métodos de PCR empezaron a estar disponibles después del desarrollo de las PCRs para *B. bovis* y *B. bigemina*. Aunque se han investigado varios genes por su utilidad en la identificación, uno de los primeros y más utilizados y, por tanto, del que se tienen más secuencias en las bases de datos genéticos, es el gen de ARN ribosomal de subunidad pequeña (18S ARNr). Gracias a las comparaciones de la secuencia de este gen, se han identificado especies de babesia en nuevos hospedadores de mamíferos, así como parásitos que poseen secuencias que incluso se ha sugerido que pueden representar nuevas especies (Devos y Geysen, 2004, Holman y col., 2005).

También se han utilizado los dominios conservados de los genes 18S ARNr para amplificar la región hipervariable V4 en ensayos de RLB para detectar y diferenciar especies de babesia en bovinos sobre la base de sus diferencias en las secuencias (Gubbels y col., 1999).

Otro gen que se han utilizado para la identificación de *B. divergens* es un fragmento del gen de la  $\beta$ -tubulina mediante un ensayo de PCR para la detección e identificación de las piroplasmosis más comunes en bovinos y equinos (Cacciò y col., 2000). El ensayo explota la amplia variabilidad genética del fragmento y, después de la amplificación de ADN del parásito mediante PCR, la identificación de especies se obtiene a partir del tamaño de los productos o por análisis de polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción (RFLP) (Cacciò y col., 2000).

La IFI es la técnica serológica más utilizada para demostrar la presencia de anticuerpos en una población. Se ha publicado que la IFI diferencia claramente entre los anticuerpos contra *B. divergens* y otras babesias bovinas, pero presenta reacciones serológicas cruzadas con otras especies, como *B. capreoli* del ciervo rojo (*Cervus elaphus*) o *B. divergens*-like (Gray y col., 1991, Holman y col., 2005). La única otra prueba serológica comúnmente utilizada para las infecciones por *B. divergens* es el ELISA, que presenta como ventaja sobre la IFI que la interpretación de los resultados es menos subjetiva y se automatiza fácilmente para un gran número de muestras (Zintl y col., 2003). Sin embargo, se requiere mucho más antígeno. Afortunadamente, el antígeno de *B. divergens* derivado de jerbos se comporta de la misma manera que el obtenido del ganado y no se presentan diferencias significativas en sensibilidad o especificidad. Asimismo, también se ha utilizado en estas pruebas el antígeno derivado de parásitos cultivados en cultivo *in vitro* (Gray y Kaye, 1991, Chauvin y col., 1995). Ambas pruebas son igualmente efectivas en la detección de muestras positivas, siendo

la IFI más adecuada para las encuestas a pequeña escala, pero para estudios grandes es preferible el ELISA (Zintl y col., 2003).

Otro problema asociado con todas las pruebas serológicas es que la relación entre los títulos de anticuerpos, la presencia de parásitos y el estado de inmunidad protectora no es clara, ya que no se detecta el parásito, sino la exposición a él. Los anticuerpos pueden persistir durante largos períodos después haberse eliminado el patógeno, sin dar información sobre cuándo se adquirió la infección ni si es actualmente activa. Además, los títulos de anticuerpos se pueden observar en ausencia de inmunidad protectora y los resultados negativos pueden ocurrir en presencia de parásitos o después de la adquisición de inmunidad estéril (Gray y Kaye, 1991, Zintl y col., 2003, Devos y Geysen, 2004).

- Tratamiento

El tratamiento de la babesiosis causada por *B. divergens* en el ganado se basa, por lo general, en el empleo de los mismos fármacos empleados en el caso de *B. bigemina*.

El dipropionato de imidocarb administrado por inyección subcutánea o intramuscular a una dosis de 1,2-3 mg/kg es el tratamiento de elección (Mosqueda y col., 2012). Sin embargo, como se ha comentado anteriormente, el imidocarb se asocia con problemas de residuos durante largos periodos después del tratamiento, lo que limita en ocasiones su empleo (Zintl y col., 2003).

Por su parte, el aceturato de diminazeno es menos efectivo en el tratamiento de la babesiosis por *B. divergens* (Mosqueda y col., 2012).

También se ha utilizado en el tratamiento de la enfermedad clindamicina combinada con quinina, dando como resultado mejorías clínicas llamativas y efectivas en animales y en el hombre (Mosqueda y col., 2012). También se ha empleado azitromicina con atovacuona o quinina, eficaz en animales de experimentación y en el ser humano (Gray, 2004, Vial y Gorenflot, 2006). El uso de la oxitetraciclina de acción prolongada contra las infecciones bovinas de *B. divergens* no tiene ningún efecto terapéutico si se administra después del inicio de la parasitemia (Zintl y col., 2003).

- Control y prevención



Se ha descrito que el ganado desarrolla una inmunidad duradera después de una sola infección con *B. divergens* (Joyner y Davies, 1967). En áreas donde esta babesiosis es endémica se puede considerar el control integrado, asegurando el contacto continuo del ganado con garrapatas y parásitos mediante la aplicación de acaricidas principalmente en los periodos de mayor exposición (Zintl y col., 2003).

Sin embargo, también se ha descrito la quimioprofilaxis con dipropionato de imidocarb, que, administrado al doble de su dosis terapéutica, puede proporcionar protección de tres a seis semanas contra la enfermedad clínica causada por *B. divergens*. Así se lograría garantizar que el ganado se infecte y sea inmune a los parásitos con mínimos efectos patológicos, pudiendo integrarse con la vacunación (Zintl y col., 2003). El uso de la oxitetraciclina de acción prolongada con fines profilácticos permite la producción de anticuerpos sin efectos clínicos. Sin embargo, se descarta su uso por el coste y el riesgo debido a la probabilidad del desarrollo de resistencia bacteriana (Taylor y col., 1986, Zintl y col., 2003).

Las vacunas vivas han demostrado ser muy efectivas y razonablemente seguras, particularmente cuando la vacunación se aplica en animales menores de un año, cuando todavía tienen resistencia natural a la enfermedad (Zintl y col., 2003). Los parásitos producidos para la vacunación se derivan de terneros esplenectomizados y también de jerbos intactos, siendo ésta última opción más segura, al eliminar el riesgo de infección con otros patógenos bovinos y el efecto de isoimmunización por la sensibilización a antígenos de los eritrocitos bovinos (Edelhofer y col., 1998). Sin embargo, la desventaja principal, además de las añadidas a este tipo de vacunas, es que la cepa de la vacuna puede causar babesiosis, ya que los métodos utilizados para reducir la virulencia no han producido resultados consistentes (Edelhofer y col., 1998).

Asimismo, se han preparado vacunas innactivadas de *B. divergens* con formalina a partir de la sangre de terneros infectados, aunque no resultan ser tan inmunógenas como las vacunas vivas y se requirieron adyuvantes tóxicos para lograr niveles aceptables de inmunidad (Edelhofer y col., 1998).

También se ha intentado identificar antígenos protectores para formar la base de una vacuna recombinante. Los primeros estudios se centraron en la capa superficial del merozoito, y se identificaron varios antígenos inmunodominantes de superficie que provocaron una respuesta humoral y celular, conservados entre aislados de diversas áreas geográficas (Gorenflot y col., 1990, Precigout y col., 1991, Valentin y col., 1993). Concretamente, se ha puesto especial atención en uno de estos antígenos, la



glicoproteína de 37 kDa (Bd37), previamente mencionada por su importancia en la unión a la superficie del eritrocito del hospedador, que se localiza en vesículas internas y en la superficie de los merozoitos (Hadj-Kaddour y col., 2007, Sun y col., 2011). Sin embargo, es importante recordar que muchos parásitos han desarrollado antígenos inmunodominantes que no son protectores o incluso inmunosupresores, y los parásitos los utilizan como mecanismos de evasión del sistema inmunitario (Carcy y col., 2006, Jackson y col., 2014). Las proteínas asociadas a la roptria, posiblemente implicadas en la invasión de las células hospedadoras, también se han identificado en *B. divergens* y pueden ser candidatas para la formulación de una vacuna combinada, ya que es común a otras babesias bovinas (Skuce y col., 1996, Zintl y col., 2003, Bock y col., 2004).

- Consideraciones de salud pública

Fue en la segunda mitad del siglo XX cuando Skrabalo y Deanovic (1957) describieron el primer caso de babesiosis humana causada por *B. divergens* en Zagreb, en un granjero que había sido esplenectomizado once años antes. Después del primer hallazgo, se ha informado de un número creciente de estas infecciones, aproximadamente 50 casos en Europa, donde más de la mitad se han producido en Francia y las Islas Británicas, aunque son difíciles de cuantificar porque muchos casos no se detectan y diagnostican correctamente, y otros no se han publicado (Kjemtrup y Conrad, 2000, Hildebrandt y col., 2013).

En España, durante el periodo 2004-2013, se diagnosticaron de babesiosis diez pacientes distribuidos predominantemente en zonas noroccidentales de la península, concretamente en Galicia, Cantabria, Asturias o Extremadura (Guerrero y col., 2017).

En las infecciones humanas con *B. divergens*, las parasitemias oscilan entre el 1% y el 50%, pudiendo llegar al 80%, con síntomas que varían desde una infección aparentemente silenciosa a una enfermedad fulminante similar a la malaria (Homer y col., 2000, Kjemtrup y Conrad, 2000). La población con mayor riesgo de adquirir la infección son agricultores, ganaderos y excursionistas que frecuenten zonas donde se encuentre el ganado vacuno. La mayoría de los pacientes han sido previamente esplenectomizados, por lo que una historia de esplenectomía, ausencia de viajes recientes a áreas endémicas de malaria, ausencia de transfusiones de sangre recientes y características citológicas compatibles, son indicaciones sólidas para el diagnóstico de babesiosis (Homer y col., 2000, Kjemtrup y Conrad, 2000). El período de prepatencia varía de una a seis semanas, y los pacientes con frecuencia presentan debilidad general.

La presentación clínica no es específica, pudiendo confundirse con otras enfermedades. Aparece repentinamente, generalmente con hemólisis intravascular grave, hemoglobinuria e ictericia, mialgia en la zona lumbar y abdominal, escalofríos y fiebre no cíclica persistente (40°C). En los casos más graves, los pacientes desarrollan insuficiencia renal y edema pulmonar (Homer y col., 2000, Kjemtrup y Conrad, 2000, Zintl y col., 2003).

Los casos debidos a infecciones por *B. divergens* en Europa son significativamente menos frecuentes, pero más graves, que los causados por otra especie de babesia capaz de infectar al hombre, *B. microti* (Schnittger y col., 2012). *B. divergens* puede llegar a ser letal en el hombre, a menos que sea tratada inmediatamente, con una tasa de mortalidad de alrededor del 50% en los pacientes esplenectomizados y del 5% en los individuos intactos. Por tanto, la detección inmediata es esencial porque la enfermedad progresa extremadamente rápido (Homer y col., 2000). La alta parasitemia presente durante la infección aguda puede detectarse microscópicamente en un frotis de sangre. En los eritrocitos humanos, el parásito presenta una apariencia atípica de *B. divergens*, es significativamente más grande que en el ganado, y las etapas del anillo se caracterizan por tener grandes vacuolas. Los merozoitos están ubicados en una posición subcentral dentro del eritrocito e, incluso, pueden aparecer tétradas. Puede confundirse con especies del género *Plasmodium*, a menos que se observen las formas piriformes emparejados, ya que también pueden aparecer con formas de anillo intraeritrocítico (Gorenflot y col., 1991, Vannier y Krause, 2012).

En general, la atovacuona, la azitromicina, la clindamicina y la quinina representan los tratamientos de elección para la babesiosis humana (Homer y col., 2000, Vannier y Krause, 2012, Hildebrandt y col., 2013). El medicamento usado contra la malaria, la cloroquina, es ineficaz contra la babesiosis, por lo que un correcto diagnóstico diferencial entre babesiosis y malaria es esencial, dada la necesidad de instaurar un tratamiento rápido y agresivo que implica terapia específica inmediata para reducir la parasitemia, combinada con tratamiento de apoyo, como transfusión de sangre y ventilación (Zintl y col., 2003). Gracias a esto se considera que se ha reducido la tasa de mortalidad de *B. divergens* al 40%, aproximadamente, en los pacientes de mayor riesgo (Zintl y col., 2003). En la actualidad, el tratamiento recomendado consiste en la administración de clindamicina intravenosa junto con quinina oral, no siendo necesario combinarlo con transfusiones sanguíneas en el caso de infecciones leves, con un 1% de parasitemia (Kjemtrup y Conrad, 2000).

### **2.2.3. THEILERIOSIS**

La theileriosis es una enfermedad causada por protozoos de diferentes especies del género *Theileria* que afecta principalmente a rumiantes domésticos y silvestres en todo el mundo con diverso grado de gravedad, aunque estos parásitos son generalmente no patogénicos en sus hospedadores silvestres (Dolan, 1989). *Theileria* se clasifica en el filo *Apicomplexa*, que comprende un gran grupo de organismos eucariotas complejos que son parásitos obligados que disponen de un complejo apical involucrado en la invasión o establecimiento del parásito en el hospedador. Dentro del filo se incluye en la clase *Aconoidasida*, en el orden *Piroplasmida*, que comprende la familia *Theileriidae*, con los géneros *Theileria* y *Haemotoxenus* (Levine, 1971, Dolan, 1989, Adl y col., 2012).

Los parásitos del género *Theileria* se describieron por primera vez en 1901 durante un brote importante de enfermedad altamente mortal en el ganado en Rodesia (Zimbabue) y poco después en Sudáfrica (Morrison, 2009). Theiler y Lounsbury llevaron a cabo investigaciones a través de una serie de experimentos con ganado y garrapatas y en 1903 demostraron que la enfermedad, conocida como *Rhodesian tick fever* o la fiebre de la costa este (o ECF, de sus siglas en inglés *East Coast Fever*), fue causada por un nuevo parásito, que era distinto de *Babesia* y su vector era *Rhipicephalus appendiculatus*. El parásito era *Theileria parva*, endémico en una gran parte de África oriental y que había sido introducido en el sur de África por ganado importado de Tanzania después de la pandemia de peste bovina (Theiler, 1903, Theiler, 1904, Morrison, 2009).

La clasificación tradicional de las especies de theileria se ha basado en la morfología, el vector, el origen geográfico y el hospedador vertebrado (Mans y col., 2015). Actualmente, el género *Theileria* comprende 26 especies y se distingue por su capacidad única de infección de los leucocitos por los esporozoítos y la maduración de los esquizontes en merozoítos, que posteriormente infectan a los glóbulos rojos para formar piroplasmas (Uilenberg, 2006). Recientemente se han empleado para su clasificación algunos marcadores moleculares, entre los que se encuentran proteínas de superficie del merozoíto y la subunidad pequeña del ARN ribosómico (Allsopp y col., 1993, Gubbels y col., 2000). El análisis de las secuencias del gen 18S ARNr demuestra que el género *Theileria* está filogenéticamente más estrechamente relacionado con el género *Babesia* que con el género *Plasmodium*, causante de la malaria en humanos y otras especies de vertebrados (Allsopp y col., 1994, Bishop y col., 2004).

Estos parásitos también se clasifican según la capacidad del parásito para “transformar” los leucocitos de los animales hospedadores para que las células infectadas proliferen indefinidamente junto con los parásitos que las ocupan (Sivakumar y col., 2014). En base a esto se establecen dos grupos, que diferencian entre especies transformadoras y no transformadoras de las células hospedadoras. Las especies que han sido descritas como transformadoras son *Theileria parva*, *Theileria annulata*, *Theileria lestoquardi*, *Theileria taurotragi* y la especie conocida como *Theileria* sp. (búfalo) (Dobbelaere y Heussler, 1999, Chaisi y col., 2011). Existen varias especies no transformadoras, que incluyen *Theileria orientalis*, *Theileria mutans*, *Theileria velifera* y *Theileria cervi*. Los parásitos no transformadores no inducen este tipo de proliferación en las células que parasitan, por lo que se consideran relativamente benignos, si bien son capaces de causar anemia en su fase intraeritrocitaria (Eamens y col., 2013).

Las diferentes **especies de theileria que afectan al ganado bovino** son *T. annulata*, *T. parva*, *Theileria* sp. (buffalo), que es una especie muy relacionada con la anterior aún sin nombre formal descrita en 1993 que afecta a los búfalos y al ganado bovino, *T. mutans*, *T. velifera*, *T. taurotragi*, *T. sinensis* y el grupo de *T. orientalis*, que incluye a *T. orientalis*, *T. buffeli* y *T. sergenti* (Allsopp y col., 1993, Morrison, 2015, Watts y col., 2015).

La mayoría de estas especies son consideradas como benignas o no patógenas, excepto aquellas que se replican de forma importante durante su desarrollo en los leucocitos, concretamente *T. parva* y *T. annulata*. Ambas se encuentran estrechamente relacionadas y causan enfermedades que originan importantes pérdidas económicas en el ganado vacuno por la elevada tasa de mortalidad, morbilidad y pérdida de producción en los animales domésticos (Uilenberg, 1995).

*T. parva* es transmitida por especies de garrapatas del género *Rhipicephalus*, causa una enfermedad mortal en el ganado bovino y también infecta al búfalo africano (*Syncerus caffer*), en el que no causa enfermedad. Las pérdidas económicas causadas por este agente se cuantificaron en 169 millones de dólares durante el año 1989 en África (Mukhebi y col., 1992), donde se limitada su distribución a partes del este, centro y sur (Uilenberg, 1995).

Mientras, se considera que *T. annulata* puede afectar a 250 millones de bovinos en un área que abarca el norte de África, el sur de Europa, el Medio Oriente y Asia Central, y también infecta al búfalo de agua asiático (*Bulbulus bubulis*) (Brown, 1990).

El verdadero impacto económico de la theileriosis tropical es difícil de evaluar (Boulter y Hall, 1999). En India, las pérdidas causadas por *T. annulata* se han estimado entre los 239,5 y los 800 millones de dólares por año (Boulter y Hall, 1999, Minjauw y McLeod, 2003).

Tanto *T. parva* como *T. annulata* inducen una transformación en el fenotipo de las células hospedadoras para su proliferación y viabilidad mediante la inducción en ellas de una resistencia a la apoptosis y la modulación de la actividad endocítica.

Tal y como se describió previamente, otras especies de theileria no son transformadoras, pero son responsables de la enfermedad en los rumiantes domésticos como resultado de la anemia inducida por la etapa intraeritrocítica. Así, el grupo de parásitos *T. orientalis* (*T. orientalis*, *T. sergenti* y *T. buffeli*) causa anemia transitoria y pérdidas de productividad, aunque rara vez es mortal (Bishop y col., 2004). Tiene una amplia distribución global (Asia, Europa, Australia y África oriental), afectando principalmente al ganado de razas no autóctonas y siendo los rebaños lecheros los más gravemente afectados, con fiebre, anemia hemolítica de gravedad variable y mortalidad en algunos animales (Morrison, 2015). El impacto económico cuantificado en Japón se estimó en más de 15 millones de dólares por año (Sugimoto, 1997).

Por su parte, las especies *T. mutans* y *T. velifera* son responsables de la enfermedad en bovinos en África, afectando particularmente a los animales de mayor edad que no han estado expuestos previamente al parásito o colaborando en infecciones mixtas con otros patógenos transmitidos por garrapatas (Morrison, 2015). El impacto económico de estas especies menos patógenas aún no se ha evaluado de forma precisa (Bishop y col., 2004).

*T. taurotragi* es considerada, por lo general, como una especie apatógena en el vacuno, pero ocasionalmente resulta fatal para su hospedador original, el eland (*Taurotragus oryx*) que se encuentra en África (Dolan, 1989, Bishop y col., 2004). Se ha demostrado en estudios *in vitro* que infecta las células linfoides de once especies diferentes de bóvidos (Morrison, 2015).

*T. sinensis* se ha descrito en China y África, donde afecta al ganado vacuno, al búfalo y al yak (*Bos mutus*) (Liu y col., 2013, Morrison, 2015), causando una enfermedad leve o apatógena. Sin embargo, este parásito puede formar un complejo de enfermedad junto con *T. annulata* y causar enfermedad por sí mismo (Liu y col., 2010).

A continuación se profundizará en los conocimientos actualmente disponibles relacionados con una de las especies del género que mayor importancia tiene en la salud y productividad del ganado vacuno a nivel mundial, *T. annulata*, que es además uno de los agentes objeto de este trabajo de investigación.

### **2.2.3.1. *Theileria annulata***

Casi al mismo tiempo que Theiler y Lounsbury describieron *T. parva* en Sudáfrica (Theiler, 1903, Theiler, 1904), se llevó a cabo la investigación de una enfermedad similar en el sur de Rusia que resultó ser causada por otra especie patógena de theileria en el ganado, *Theileria annulata* (Dschunkowsky y Luhs, 1904), que recibió posteriormente el nombre de theileriosis tropical o mediterránea (Morrison, 2009).

Este hemoparásito da lugar a una enfermedad linfoproliferativa grave, y, a menudo fatal, para el ganado bovino, que también es capaz de infectar al búfalo de agua asiático (*Bulbulus bubulis*) (Dolan, 1989, Brown, 1990).

Como se ha comentado, se considera que *T. annulata* puede afectar a 250 millones de bovinos, ya que su distribución se ha descrito desde el sur de Europa y el norte de África, extendiéndose a través de Egipto hasta el norte de Sudán y el Cercano y Medio Oriente, incluyendo India y Asia Central (Dolan, 1989, Jacquet y col., 1990). No está claro dónde se encuentra exactamente su límite oriental (Uilenberg, 1995), por lo que su impacto económico es difícil de valorar (Boulter y Hall, 1999). Se llevó a cabo un estudio de campo con el objetivo de estimar los costos de la theileriosis tropical en una región endémica del norte de Túnez, donde se monitorizaron tres granjas de animales cruzados con frisón durante dos años sucesivos y se concluyó que la mitad del coste total se debía a una infección asintomática, no relacionándose únicamente las pérdidas con el tratamiento y la mortalidad (Gharbi, M. y col., 2006).

#### ○ Parasitología y epidemiología

*T. annulata* se caracteriza, tal y como se describirá más adelante, por tener una primera fase linfoproliferativa, en la que pueden identificarse tanto esporozoítos (2  $\mu$ m) como grandes esquizontes (de aproximadamente 10-15  $\mu$ m de diámetro) (Mehlhorn y Shein, 1984) que se encuentran en las células del linaje mieloide, monocitos y macrófagos, aunque también puede infectar a los linfocitos B (Bishop y col., 2004). Posteriormente dan lugar a la formación de merozoítos (con forma de pera

y un tamaño de 0,6-2  $\mu\text{m}$ ) que invaden a los eritrocitos (Mehlhorn y Shein, 1984). A continuación, en el interior de los eritrocitos se pueden observar las theilerias con forma de coma (2,5  $\mu\text{m}$ ), así como esféricas u ovoides (0,5 a 0,6  $\mu\text{m}$ ) (Mehlhorn y Shein, 1984).

Gracias a la capacidad de *T. annulata* de dividirse al mismo tiempo que la célula hospedadora, se asegura que la infección se conserve en las células hijas (Bishop y col., 2004). Esto ha podido confirmarse gracias al establecimiento de cultivos en líneas celulares linfoblastoides infectadas con *T. annulata* a partir de tejidos de bovinos infectados o de esporozoítos derivados de garrapatas (Viseras y col., 1997). Este aislamiento y cultivo de *T. annulata* ha permitido tanto avanzar en el conocimiento de la patogenia de este parásito como obtener antígeno y ADN para el diagnóstico serológico y molecular y para llevar a cabo trabajos encaminados al desarrollo de una vacuna (Viseras y col., 1997, Martín-Sánchez y García-Fernández, 1999).

Los estudios del genoma de *T. annulata* han permitido confirmar un tamaño aproximado de 8,35 Mpb organizado en cuatro cromosomas (Pain y col., 2005). Una vez que la secuencia del genoma de *T. annulata* fue completada, fue posible desarrollar un panel de marcadores genéticos para estudios de población con el fin de caracterizar el polimorfismo de este parásito y determinar su especificidad de especie. Este tipo de análisis genético ha confirmado un alto nivel de diversidad genotípica tanto entre países como dentro de ellos (Weir y col., 2007, Weir y col., 2011).

La theileriosis bovina se **transmite** por distintas especies de garrapatas ixódidas del género *Hyalomma*. En España, las especies de *Hyalomma* que transmiten *T. annulata* son *H. marginatum* y *H. lusitanicum* (Habela y col., 1999, Viseras y col., 1999). *H. marginatum* se encuentra en toda la península, excepto en el norte, estando presente también en las Islas Baleares (Habela y col., 2002). Los adultos infestan a bóvidos y otros ungulados, como caballos, ovejas y cabras, mientras que los estadios inmaduros se alimentan de la sangre de pequeños mamíferos, como liebres, conejos y erizos, y de pájaros (Estrada-Peña y col., 2004). La otra especie de garrapata, vector de *T. annulata* en España, es *H. lusitanicum*. Esta especie se encuentra en el centro, sur peninsular y ambos archipiélagos. Sus adultos se encuentran en bóvidos y otros rumiantes, y las formas inmaduras en pequeños animales, comúnmente conejos, pudiéndose encontrar en grietas de las rocas o dentro de las madrigueras de los conejos (Habela y col., 2002, Estrada-Peña y col., 2004).

La transmisión ocurre transestadialmente, lo que significa que las infecciones



adquiridas por larvas y ninfas son transmitidas a nuevos hospedadores por ninfas y adultos, respectivamente (Habela y col., 2002). En un estudio sobre transmisión con adultos de *Hyalomma anatolicum* se concluyó que las garrapatas machos son menos capaces de transmitir theileriosis que las hembras, ya que el número de acinos salivales infectados fue mayor en las hembras (Sangwan y col., 1989). Esto también se observó en un estudio de campo donde se estudiaron 5.083 garrapatas, donde la prevalencia de la infección fue mayor en las garrapatas hembra que en los machos y los casos de theileriosis tropical siguieron al pico de las garrapatas hembra infectadas (Bouattour y col., 1996). Por tanto, estas últimas podrían tener un papel más importante en la transmisión de *T. annulata* (Sangwan y col., 1989, Bouattour y col., 1996).

Por otra parte, se ha observado que los terneros se infestan con garrapatas adultas solo cuando el nivel de infestación del ganado de mayor edad es alto (Bouattour y col., 1996, Darghouth y col., 1996). El motivo de la baja susceptibilidad de los terneros a las garrapatas adultas aún no se ha dilucidado, pero podría deberse a una superficie corporal más pequeña que conduce a la liberación de menos CO<sub>2</sub> (Bouattour y col., 1996). Esto conduce a una reducción en la incidencia de infección por *T. annulata*, de forma que solo el 10% de los casos de theileriosis tropical se observan en animales de menos de un año (Bouattour y col., 1996, Darghouth y col., 1996).

Además, se ha comprobado que *T. annulata* puede transmitirse mecánicamente, mediante la inoculación de sangre de un animal con infección patente (Brown, 1990).

*T. annulata* infecta al ganado bovino, siendo responsable de la theileriosis tropical (Bishop y col., 2004). El **hospedador** principal de *T. annulata* es el búfalo de agua asiático (*Bulbulus bubulis*), en las zonas donde habita, en el cual el parásito normalmente no causa ninguna enfermedad. La infección por *T. annulata* también puede ocurrir en ovejas y cabras, pero generalmente de forma subclínica (Campbel y Spooner, 1999).

Cuando el ganado se recupera de la infección, el animal permanece casi siempre como **portador** a largo plazo con un bajo número de eritrocitos infectados (Almería y col., 2001), gracias a la respuesta inmunitaria que desarrolla (Morrison, 2015). Estos animales tienen un importante papel en la epidemiología, al actuar como **reservorios**, pudiendo asimismo reestablecerse en ellos un proceso clínico más o menos grave al interrumpirse el equilibrio parásito-hospedador en un momento de inmunosupresión resultante del estrés (Gonzalez y Astiz, 2002, Gomes y col., 2013, Mohmad y col., 2018). Los estudios epidemiológicos han definido dos situaciones en las que puede encontrarse la theileriosis bovina causada por *T. annulata* en una zona en concreto: la



estabilidad endémica, donde la mayoría de los animales están infectados, pero la enfermedad ocurre principalmente en terneros y jóvenes; y la inestabilidad endémica, donde el desafío es relativamente bajo y la enfermedad ocurre en animales de todas las edades (Darghouth y col., 1996).

▪ *Situación en España*

La theileriosis mediterránea en España es conocida desde principios del siglo XX. Viseras y colaboradores indicaron en una revisión sobre la theileriosis bovina en España publicada en 1996 que la primera noticia de la existencia de piroplasmosis en nuestro país se debe a Pittaluga en 1912. No obstante, en 1928 es Salvans-Bonetén quién describe la existencia frecuente de casos de piroplasmosis en Berga (Barcelona), si bien en sus observaciones microscópicas no logra discernir el agente etiológico. A partir de ese momento, cada año se han notificado casos clínicos de esta enfermedad en diferentes áreas del país (Miranda, 1945). Los primeros trabajos de serodiagnóstico de *T. annulata* se llevaron a cabo en Madrid y Castilla La Mancha, con más de 500 animales de distintas explotaciones lecheras con antecedentes o presencia de piroplasmosis, determinando una prevalencia mediante la técnica de IFI mayor del 90% (Brandau y col., 1989). En otras zonas de España también se han llevado a cabo estudios epidemiológicos mediante esta misma técnica, como en la comarca de la Vega en Granada, donde se halló una seroprevalencia del 14,52% en ganado de la raza frisona (Aranda y col., 1993), mientras que un estudio realizado en ganado de lidia procedente de Extremadura, Salamanca y Albacete determinó una prevalencia del 75,1% (García-Fernández y col., 1996), y en la provincia de Jaén, con un total de 95 animales aparentemente sanos de diferentes aptitudes (lechera, cárnica y de lidia), se encontró una prevalencia del 56,8% (Viseras y col., 2000).

En cuanto a las prevalencias descritas en ganado vacuno en España mediante técnicas moleculares, se observa una gran variación en función de la zona geográfica. *T. annulata* se ha descrito como una especie endémica en las zonas del sur y oeste de nuestro país, como Extremadura y Andalucía, así como en Menorca, por diferentes autores (Habela y col., 1999, Viseras y García-Fernandez, 1999, Almería y col., 2001). En concreto, se han descrito prevalencias del 75% en Extremadura (d'Oliveira y col., 1995, Habela y col., 1999), del 92,8% en Toledo (Gubbels y col., 1999), del 41,3% al 64,7% en Menorca (Almería y col., 2001, Almería y col., 2002, Almería y col., 2009, Ros-García, García-Pérez y col., 2012), del 31,8% en Granada (Martín-Sánchez y col., 1999) y del 100% en Cádiz (Gubbels y col., 1999, Martín-Sánchez y col., 1999). En un estudio con 214 animales procedentes de Alicante, Badajoz, Cádiz, Córdoba, Granada y Sevilla,

donde se incluían razas de aptitud lechera y de lidia, la prevalencia fue del 70,3% mediante PCR anidada (Martín-Sánchez y col., 1999).

En cuanto a otras regiones del país, en un estudio donde se recogieron muestras de 77 granjas de la mitad norte de España y dos del sur de España, *T. annulata* fue amplificado en 12 granjas. Concretamente, en las dos granjas del sur, una de la zona del mediterráneo y las nueve restantes en el norte. La prevalencia molecular fue del 8,4% (García-Sanmartín y col., 2006).

- Patogenia y respuesta inmunitaria

Al igual que para otros apicomplejos, *T. annulata* se desarrolla en una fase sexual y una asexual en el hospedador invertebrado (garrapata), donde se produce la gametogonia y la esporogonia, para continuar con la fase asexual (esquizogonia) en el hospedador vertebrado (Habela y col., 2002).

*T. annulata* presenta una primera fase sexual de su ciclo biológico dentro del **vector**. Los glóbulos rojos parasitados con merozoítos que son ingeridos por la garrapata durante la alimentación en un hospedador vertebrado infectado, se liberan durante la digestión y dan lugar a la gametogonia, con la formación de los gametos en el intestino. Los gametos haploides se fusionan para formar un cigoto, la única célula diploide, y, a continuación, se produce una división meiótica en dos pasos para dar lugar a un cigoto haploide (Gauer y col., 1995). El cigoto origina quinetos haploides móviles que infectan las células epiteliales del intestino y migran por la hemolinfa para, posteriormente, infectar las glándulas salivales, donde se produce la fase de esporogonia, con la formación de esporozoítos. Los esporozoítos haploides dependen de estos vectores para inocularse al hospedador vertebrado (Mehlhorn y Shein, 1984, Viseras y col., 1996, Habela y col., 2002). Se ha descrito que *T. annulata* se somete a un intercambio genético durante las etapas del ciclo de vida en la garrapata (Weir y col., 2007).

El parásito entra en el **hospedador bovino** durante el periodo de alimentación de la garrapata como esporozoíto, y en él desarrollará la fase asexual de esquizogonia. Los esporozoítos invaden en una primera fase las células mononucleares, en concreto los macrófagos/monocitos y los linfocitos B del nódulo linfático que drena la zona de anclaje de la garrapata, dando como resultado un aumento de tamaño de los nódulos linfáticos, para, posteriormente, desarrollarse en las células del linaje de macrófagos de diferentes tejidos, como el hígado y el bazo (Viseras y col., 1996, Preston y col.,

1999). Los esquizontes se diseminan a todas las demás partes del sistema linfoide, incluidos el timo, el bazo y los ganglios linfáticos alejados del sitio de infección, así como una serie de otros órganos no linfoides, como riñón, pulmón, abomaso, glándulas suprarrenales y glándula pituitaria, para alcanzar posteriormente el cerebro y el corazón (Forsyth y col., 1999).

Por tanto, los esporozoítos de *T. annulata* pueden invadir diferentes tipos celulares, pero sólo transforman las células que expresan en su superficie CD14, receptor de lipopolisacáridos, concretamente las células del linaje de los macrófagos y un pequeño número de células B presentes en sangre periférica bovina (Campbel y Spooner, 1999). El mecanismo de invasión celular del esporozoíto es mediante contacto entre las membranas del parásito y de la célula hospedador en cualquier orientación. A medida que la superposición de las membranas se extiende lateralmente, el esporozoíto penetra progresivamente en la superficie de la membrana de la célula hospedadora hasta que el borde de la invaginación se cierra y se funde sobre el parásito (Mehlhorn y Shein, 1984).

En el interior de las células leucocitarias del hospedador bovino, el esporozoíto se somete a un proceso de esquizogonia que da lugar a la producción de esquizontes multinucleados, macroesquizontes, que transforman las células infectadas a un estado de proliferación descontrolada, la fase linfoproliferativa. A medida que la infección progresa, los parásitos se someten a una diferenciación para formar merozoítos uninucleados durante la merogonia (Gauer y col., 1995). Estos se liberan de las células de los tejidos de todo el cuerpo para invadir los eritrocitos, penetrando en ellos de manera aparentemente activa (Mehlhorn y Shein, 1984), donde se convierten en piroplasmas infecciosos para las garrapatas (Campbel y Spooner, 1999). Los merozoítos formados dentro de los linfocitos del hospedador se encuentran en los eritrocitos ocho días después de la infección por *T. annulata*, pudiendo infectarse hasta el 90% de los eritrocitos (Mehlhorn y Shein, 1984). La alta multiplicación intraeritrocítica del piroplasma resulta en anemia debido a la lisis de los eritrocitos (Bishop y col., 2004). Además, hay que añadir que la anemia se agrava por la destrucción de los eritrocitos parasitados por la fagocitosis en el bazo, los ganglios linfáticos y otros órganos del sistema reticuloendotelial (Sandhu y col., 1998).

Tal y como se ha mencionado previamente en esta revisión bibliográfica, los macrófagos y las células B infectadas se transforman por la infección por *T. annulata*. Concretamente se produce un aumento en la proliferación celular, gracias a la producción de IL-2 e IFN- $\gamma$ , así como una disminución de la apoptosis, siendo ambas

transformaciones reversibles (Campbel y Spooner, 1999). En un principio se evita la apoptosis de los macrófagos en gran medida a través de la acción del IFN- $\gamma$ , que induce la producción de IL-1 y TNF- $\alpha$  y factores de crecimiento autocrinos que estabilizan la célula en división. Posteriormente, este mecanismo deja de ser necesario, dado que las células infectadas producen sus propios factores de crecimiento a través del control de la expresión de genes, ya sean derivados de la célula hospedadora o del parásito (Campbel y Spooner, 1999, Shiels y col., 2006).

*T. annulata* es un parásito intracelular controlado por una **respuesta inmunitaria** innata y adaptativa, que estimula una inmunidad sólida a la reinfección que es específica de la cepa (Preston y col., 1999, Sivakumar y col., 2014). En las infecciones primarias de *T. annulata*, la etapa de esquizonte está controlada por la respuesta inmunitaria innata (en la que participan células NK y macrófagos) y la respuesta inmunitaria adaptativa de tipo celular (en la que participan células T citotóxicas o Tc y células T colaboradoras o Th) (Ahmed y Mehlhorn, 1999). Tanto los linfocitos T como B son activados durante la infección por *T. annulata*. Los anticuerpos son detectables contra todas las etapas del parásito en una fase posterior de la infección, cuando ya ha sido controlada. Sin embargo, aunque los anticuerpos son capaces de neutralizar a los esporozoitos, no previenen el inicio de una infección. Las células T participan actuando como linfocitos Tc, estrechamente relacionados con el control de la infección, y como linfocitos Th (Preston y col., 1983). Ambos reconocen los antígenos del parásito, que son presentados por las células infectadas a través del CMH de clase I y CMH de clase II, respectivamente. Por un lado, las células Th proliferan y producen IL-2 e IFN- $\gamma$  (Ahmed y col., 1989). La IL-2 estimula a las células Tc para su expansión y posterior destrucción de las células diana, mientras que el IFN- $\gamma$  activa a los macrófagos para producir óxido nítrico, para destruir los esquizontes dentro de las células infectadas. Las citocinas también son necesarias para la inducción de anticuerpos específicos del parásito. El papel de las células NK no está claro, pero pueden actuar mediante la lisis inespecífica de células que contienen parásitos o pueden activar macrófagos mediante la producción de IFN- $\gamma$  (Preston y col., 1999, Ahmed y col., 2008).

Por otra parte, *T. annulata* es capaz de evadir las respuestas inmunitarias del hospedador vertebrado, lo que favorece el mantenimiento de la infección y permite que los animales que se recuperan de la infección aguda actúen como portadores, al mantenerse un bajo número de eritrocitos infectado (Mans y col., 2015, Morrison, 2015). Concretamente, la **evasión inmunitaria** de *T. annulata* se ve facilitada por la diversidad genética en sus determinantes antigénicos, lo que potencialmente da como

resultado una pérdida del reconocimiento por parte del receptor de las células T (MacHugh y col., 2011). Además, los macrófagos infectados por esquizontes de *T. annulata* dentro del nódulo linfático de drenaje producen niveles más altos del CMH II. Esto hace que las células T, tanto CD4 como CD8, proliferen de forma anormal e inespecífica, abandonando el nódulo linfático en un número elevado una vez son activadas. Las que permanecen en el nódulo linfático dan lugar a una respuesta no funcional, por la alteración de la expresión de CD2, una molécula esencial en la adhesión a las células diana (Campbel y Spooner, 1999). Además, la producción de IL-2 e IFN- $\gamma$  por parte de las células T activadas no da como resultado una respuesta protectora, ya que niveles elevados de IFN- $\gamma$  son responsables del bloqueo de la diferenciación de las células B (Campbel y Spooner, 1999, Glass, E. J., 2001). Esta estimulación inicial de linfocitos desencadena mecanismos supresores que, si no están regulados, también inhiben las respuestas de los linfocitos dependientes de antígenos, lo que permite la multiplicación de parásitos de forma incontrolada y promueve la enfermedad (Preston y col., 1999, Graham y col., 2001, Preston y col., 2002).

Se encuentran diferencias en la **susceptibilidad** a la infección por *T. annulata* entre las especies de bóvidos. Los bovinos *Bos taurus* y sus cruces son más susceptibles que los animales de la especie *Bos indicus* (Bakheit y Latif, 2002, Glass, y col., 2005). Concretamente, al comparar los bovinos de raza frisona con las razas sahiwal y kenana se ha observado una alta tasa de multiplicación de los esquizontes en el ganado frisón con una mayor producción y duración de proteínas de fase aguda inducidas por citocinas inflamatorias producidas por los macrófagos en respuesta a la infección experimental con *T. annulata* (Bakheit y Latif, 2002, Glass y col., 2005). Estos resultados llevaron a la hipótesis de que los macrófagos en *B. indicus* son capaces de controlar el aumento en la producción de citocinas que genera la infección por *T. annulata*, que es tan devastadora en las razas de *B. taurus* susceptibles (Glass y Jensen, 2007). Así, en un enfoque de genómica funcional se reveló que las respuestas transcripcionales de los macrófagos de *B. taurus* estaban más asociadas con la producción de citocinas inflamatorias que los macrófagos de *B. indicus* (Jensen y col., 2008, Glass y col., 2012).

- Signos clínicos y lesiones

En la enfermedad se describen cuatro cursos clínicos: sobreagudo y agudo, en animales que no han tenido contacto previo con el parásito; el curso crónico, que se puede observar en animales que ya han tenido contacto con el agente o en portadores;

y la forma clínica subaguda, que es la más frecuente, donde se producen los mismos signos que en la forma aguda, siendo estos de menor gravedad (Gonzalez y Astiz, 2002).

Los signos típicos causados por la infección con *T. annulata* son hipertermia (40-42°C), aumento de tamaño de los nódulos linfáticos, ictericia, palidez de mucosas e inapetencia, que conlleva una anorexia y pérdida de peso progresiva del animal (Viseras y col., 1996, Gonzalez y Astiz, 2002). En casos graves, como consecuencia de la anemia y de las lesiones producidas en el pulmón por la linfocitosis, aparecen taquicardia y disnea, que pueden ser más acusadas según avanza el proceso hasta la muerte del animal por insuficiencia cardio-respiratoria (Viseras y col., 1996). En el caso de animales de aptitud lechera que se encuentren en lactación, se observa un descenso en la producción en infecciones crónicas (Ros-García, García-Pérez y col., 2012). En ocasiones, en algunos casos se puede presentar opacidad corneal, lagrimeo y exoftalmia (Sandhu y col., 1998, Abd, 2015).

En la necropsia encontramos animales anémicos, caquéticos e ictéricos en la forma aguda o subaguda de la enfermedad, con linfadenomegalia, esplenomegalia y hepatomegalia, con la vesícula biliar repleta de bilis espesa. También se han descrito la presencia de petequias en las mucosas, submucosas y tejido subcutáneo (Branco y col., 2010) e inflamación en el aparato digestivo, con áreas multifocales con erosión, ulceración y presencia de focos necróticos en la membrana mucosa abomasal (Gupta y col., 2016). Asimismo, se ha descrito la existencia de ascitis y glomerulonefritis con infartos renales (Sandhu y col., 1998, Gupta y col., 2016). En la forma hiperaguda, encontramos edema pulmonar masivo, enfisema, hiperemia, hidrotórax e hidropericardio (Gonzalez y Astiz, 2002). Aparecen hemorragias extensas que afectan a casi todos los tejidos y órganos. Y, al igual que en el cuadro agudo, hepatomegalia con hepatitis y la vesícula biliar repleta de bilis espesa y oscura, linfadenomegalia y esplenomegalia (Forsyth y col., 1999, Gonzalez y Astiz, 2002).

- Hallazgos laboratoriales

La gravedad de la infección se relaciona con los cambios que se dan en los parámetros sanguíneos (Abd, 2015). Las alteraciones hematológicas que se observan son: anemia, leucopenia y linfopenia en la infección aguda. En la fase de piremia aparece una fase linfodestructiva que se asocia con una marcada leucopenia inicial, seguida por una marcada anemia normocítica y normocrómica (d'Oliveira y col., 1995, Sandhu y col., 1998). La caída del hematocrito y del recuento de glóbulos rojos y de

concentración de hemoglobina pueden llegar hasta menos de un tercio de su valor normal y resulta en una hiperbilirrubinemia que conduce a una marcada ictericia (Viseras y col., 1996, Sandhu y col., 1998).

Las alteraciones bioquímicas indican la extensión del daño tisular, como un incremento de la actividad sérica de las enzimas AST, ALT y GGT que se derivan del daño hepático (Sandhu y col., 1998). En ocasiones este daño hepático puede llegar a producir hipoproteïnemia con hipoalbuminemia. Además se observa un aumento en los niveles de bilirrubina por la destrucción de los eritrocitos parasitados (Sandhu y col., 1998). Pero no sólo el hígado se afecta, sino que la función renal también se altera, como lo confirma un incremento en los niveles séricos del nitrógeno ureico en sangre (BUN, de sus siglas en inglés *blood urea nitrogen*), el ácido úrico y la creatinina (Sandhu y col., 1998, Forsyth y col., 1999).

- Diagnóstico

Al igual que lo descrito previamente para otros agentes de transmisión vectorial, entre los métodos de diagnóstico de la theileriosis bovina se incluyen tanto métodos directos como indirectos, que se emplearán en aquellos casos sospechosos de padecer la enfermedad o de ser portadores asintomáticos en base al cuadro clínico y a los datos epidemiológicos disponibles.

La detección microscópica directa de los piroplasmas y esquizontes en los frotis de sangre o los frotis de nódulos linfáticos teñidos con Giemsa son las pruebas de diagnóstico estándar (Gupta y col., 2016). Esta técnica generalmente es adecuada para la detección de infecciones agudas, evidenciándose el parásito en animales con signos clínicos de la enfermedad (Tuli y col., 2015). Sin embargo, estas pruebas tradicionales son menos sensibles e ineficaces en el diagnóstico de portadores asintomáticos, debido a los bajos niveles de parasitemia, haciéndose necesario un concienzudo examen para encontrar los organismos. Además, la diferenciación morfológica de las especies de theileria por estas técnicas es difícil y en ocasiones concurren infecciones mixtas (Almería y col., 2001, García-Sanmartín y col., 2006).

La PCR permite un diagnóstico más específico y sensible, incluso con bajos niveles de parasitemia. Estas técnicas se utilizan con frecuencia en estudios epidemiológicos. Entre las regiones amplificadas para diagnóstico molecular, el gen *TamS1*, que codifica el antígeno de superficie principal de 30 kDa del merozoíto, es el más utilizado (d'Oliveira y col., 1995, Habela y col., 1999, Martín-Sánchez y col., 1999,



Shiels, 1999, Santos y col., 2013). Los ensayos de PCR cuantitativa, mediante la amplificación del gen 18S ARNr, permiten detectar y cuantificar las cargas infectivas de *T. annulata*, pudiendo ser interesante para el estudio de los animales portadores o para la evaluación de la eficacia de tratamientos y medidas de control aplicadas (Ros-García, Nicolás y col., 2012).

También se han empleado ensayos moleculares basados en la técnica RLB que implica la amplificación por PCR de la región hipervariable V4 de los dominios conservados de los genes 18S ARNr de todas las especies de theileria, y la posterior hibridación de los amplicones con oligonucleótidos específicos de especie para identificar simultáneamente las diferentes especies presentes en muestras individuales de animales, incluso portadores (Gubbels y col., 1999). Sin embargo, esta técnica es laboriosa y su interpretación es subjetiva.

Posteriormente se ha desarrollado una prueba basada en la tecnología Luminex® xMAP, que incorpora una matriz en suspensión con microesferas con diferentes sondas de ADN o antígenos proteicos en su superficie y teñidas internamente con fluorocromos para su lectura. Esta tecnología, además de detectar mediante una interpretación objetiva, basada en valores numéricos, y diferenciar las especies bovinas de theileria, proporciona una mayor sensibilidad y capacidad de diagnóstico múltiple que la técnica RLB (Ros-García, García-Pérez y col., 2012, Ros-García, Juste y col., 2012).

Las pruebas serológicas también se usan en estudios epidemiológicos (Salih y col., 2007). La serología llevada a cabo por IFI utiliza antígeno preparado a partir de esquizontes derivados de animales infectados o de cultivo celular. Sus inconvenientes son la interpretación subjetiva de resultados, que requiere de experiencia para la lectura (Mans y col., 2015), y la reactividad cruzada con anticuerpos de otras especies de theileria que deriva del uso del antígeno a partir del parásito entero (Mans y col., 2015). Así, se ha descrito que el empleo de ciertos ensayos ELISA utilizando antígenos recombinantes, como TamS1, podría ser más fácil, de menor coste y ser más reproducible (Gubbels y col., 2000). No obstante, el uso de este ELISA no proporciona una sensibilidad y especificidad mayor que mediante el uso de IFI, al no detectar animales infectados antes de tres meses después de la infección y, además, se ha confirmado la existencia de reacciones cruzadas con *T. parva* (Gubbels y col., 2000). Los antígenos TaSP, una proteína de superficie de *T. annulata* codificada por un gen de copia única que se expresa en las etapas de esporozoíto y esquizonte, son muy adecuados para la detección de anticuerpos específicos de *T. annulata* en las muestras de campo, con una sensibilidad del 99,1% y una especificidad del 90,47% tomando



como referencia la técnica IFI. El ELISA TaSP es capaz de detectar anticuerpos muy por encima del valor de corte de seis semanas después de la infección y permanece detectable 12 semanas después de la infección (Salih y col., 2005, Seitzer y col., 2007).

- Tratamiento

El tratamiento de elección de la theileriosis causada por *T. annulata* son las naftoquinonas por su eficacia. Sin embargo en nuestro país no está permitido su uso en animales de producción. No obstante, es interesante destacar que la tasa de recuperación clínica con estos fármacos es alta, del 80 al 94%, no eliminando completamente al parásito, por lo que los animales permanecen como portadores (Olmeda, Valcárcel y col., 2002). Concretamente, la buparvacuona (a dosis de 2,5 mg/kg de peso vivo administrada de forma intramuscular) es activa contra la etapa de esquizonte y produce una rápida recuperación en infecciones agudas (Boulter y Hall, 1999, Olmeda, Valcárcel y col., 2002), mientras que la parvacuona (10 mg/kg de peso vivo intramuscular) es activa contra todas las etapas de theileria pero no presenta una acción tan rápida como la buparvacuona contra los signos de la enfermedad (Singh y col., 1993, Boulter y Hall, 1999, Olmeda, Valcárcel y col., 2002). Sin embargo, su uso es limitado por su coste y porque hay que tratar a los animales en estadios tempranos de la enfermedad para que el tratamiento sea efectivo. Además, hay recientes estudios que hablan sobre la aparición de cepas de *T. annulata* resistentes a la buparvacuona (Mhadhbi y col., 2010, Sharifiyazdi y col., 2012). La halofuginona también se ha utilizado pero, a pesar de ser relativamente barata, tiene un rango terapéutico estrecho (Boulter y Hall, 1999).

La oxitetraciclina de acción prolongada tiene un efecto curativo limitado y permite la supervivencia del animal infectado sólo si se trata en el momento de la infección y esta no es muy grave. La clortetraciclina es moderadamente eficaz frente a las esquizogonias (Dolan, 1989, Boulter y Hall, 1999, Olmeda, Valcárcel y col., 2002).

El tratamiento sintomático debe ajustarse a la situación clínica del animal. En general, consta de la aplicación de un tratamiento de apoyo y sintomático, con vitaminas A y E, hepatoprotectores, broncodilatadores y antiinflamatorios no esteroideos (Olmeda, Valcárcel y col., 2002). La terapia de apoyo para infecciones por *T. annulata* debería incluir transfusiones de sangre, en los casos necesarios, y medidas adecuadas para corregir las funciones hepáticas y renales (Sandhu y col., 1998).

- Control y prevención

El método más ampliamente utilizado para el control de theileriosis incluye el control de garrapatas con acaricidas (Dolan, 1989). El control de la enfermedad mediante la prevención de la infestación por garrapatas requiere una aplicación esencialmente continua de acaricidas y, por lo tanto, es costoso y difícil de mantener. Pero, como se ha comentado anteriormente, el uso de estos compuestos también puede dar como resultado la selección de poblaciones de garrapatas resistentes a acaricidas (Darghouth y col., 1999). Por tanto, es necesario conocer las especies de garrapatas que se encuentran en la zona para tratar de aplicar los antiparasitarios en el momento adecuado, así como alternar fármacos (Olmeda, Valcárcel y col., 2002).

Por otro lado, es necesario conocer el estatus de los animales, ya que el contacto con el agente confiere cierta protección si los animales se encuentran en áreas de estabilidad endémica, donde hay un equilibrio entre el parásito y el hospedador (Darghouth y col., 1999). Si se da esta situación de equilibrio, hay que tratar de mantener dicha estabilidad a través del mantenimiento del contacto continuo con el agente, especialmente cuando los animales son jóvenes (Bouattour y col., 1996, Darghouth y col., 1996). No obstante, debe recordarse que estos animales jóvenes pueden desarrollar la enfermedad clínica durante el primer contacto con el agente, por lo que será necesario aplicar acaricidas para reducir la infestación por garrapatas, reduciendo así la carga parasitaria (Morrison, 2015). También se ha descrito la posible aplicación de oxitetraciclina de forma profiláctica, administrada en el momento de la infección (Olmeda, Valcárcel y col., 2002). Sin embargo, en general no se considera que exista un tratamiento que actúe como profiláctico de forma eficaz (Olmeda, Valcárcel y col., 2002).

En áreas libres, el control de los vectores es especialmente importante, así como el control de los animales que se vayan a introducir en la explotación, que deben no haber tenido contacto previo con el agente (Olmeda, Valcárcel y col., 2002). La caracterización de estas situaciones endémicas, que están condicionadas por los niveles de la población de garrapatas y los aspectos cuantitativos de la infección, son muy importantes para el control de la theileriosis clínica (Darghouth y col., 1999).

Por todas estas limitaciones, se hace necesario el uso de vacunas atenuadas, principalmente en zonas colindantes a zonas endémicas donde existe más probabilidades de brotes clínicos, así como en ganado joven en zonas endémicas para intentar lograr una estabilidad endémica (Olmeda, Valcárcel y col., 2002).

Las vacunas atenuadas han estado disponibles durante más de 40 años ya que proporcionan una protección sólida (Nene y Morrison, 2016). Sin embargo, las desventajas prácticas, que veremos a continuación, han limitado su aplicación generalizada, por lo que se trabaja para desarrollar vacunas alternativas, recombinantes y de subunidades (Morrison y McKeever, 2006).

Los pases seriados en cultivo a largo plazo atenúan la patogenicidad de *T. annulata* en las células infectadas con esquizontes, pero se conserva su infectividad, por lo que se han empleado para producir vacunas atenuadas, en las que las theilerias han perdido su virulencia pero no su poder inmunógeno (Tait y Hall, 1990). Se han recomendado en ganado joven, ya que proporcionan una protección sólida. La vacuna de cultivo celular protege a la mayoría de las razas de ganado frente a la exposición homóloga, si bien debe tenerse en cuenta que a veces los animales vacunados pueden desarrollar reacciones graves cuando se exponen posteriormente con un aislado de parásito diferente (Brown, 1990, Tait y Hall, 1990, Boulter y Hall, 1999, Morrison y McKeever, 2006).

Además, debe considerarse que la capacidad de producir la etapa de merozoíto se reduce, tanto *in vivo* como *in vitro*, perdiendo la capacidad de producir piroplasmas intraeritrocitarios y, por tanto, su infectividad para las garrapatas, algo que supone una ventaja en áreas no endémicas (Brown, 1990). Este tipo de vacuna se pueden crioconservar para su almacenamiento y transporte, aunque una vez descongelada, la vacuna tiene una vida útil limitada, a menos que se inicie un cultivo adicional (Brown, 1990). Sin embargo, además de no proteger contra cepas heterólogas, no previene la infección natural con garrapatas y, por lo tanto, no puede utilizarse como un medio para erradicar la enfermedad (Tait y Hall, 1990).

Debido a la limitación de las vacunas vivas disponibles, se han hecho esfuerzos para desarrollar vacunas alternativas, recombinantes y de subunidades, basadas en el uso de antígenos definidos para estimular una respuesta inmunitaria (Nene y Morrison, 2016). Dada la evidencia de que la patogenia de las infecciones por *T. annulata* es atribuible en gran medida a las etapas intraleucocitarias y que la inmunidad adquirida después de la recuperación de la infección está mediada por células T, los antígenos reconocidos por los linfocitos T en los leucocitos infectados representan los mejores candidatos para las vacunas de subunidad (Morrison y McKeever, 2006). Suponiendo que se puedan generar respuestas inmunitarias protectoras utilizando antígenos definidos, dicha protección deberá ser efectiva contra cepas antigénicamente diferentes. En cualquier caso, no se encuentran disponibles este

tipo de vacunas y parece ser que es poco probable que estén disponible en el futuro cercano (Morrison y McKeever, 2006, Nene y Morrison, 2016).



### 3. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS



---

### 3.1. JUSTIFICACIÓN

---

En la actualidad, muchas enfermedades de transmisión vectorial son consideradas enfermedades emergentes, con gran importancia tanto para la salud de los animales domésticos y salvajes como para el hombre. Entre los vectores artrópodos, las garrapatas son capaces de transmitir más especies patógenas que ningún otro y diferentes estudios han mostrado que su distribución y abundancia, así como las de los patógenos que transmiten, se están incrementando en Europa y Norteamérica.

En la comprensión de la epidemiología de las enfermedades transmitidas por garrapatas es imprescindible considerar todos los factores capaces de afectar a la dinámica tanto de las propias garrapatas como de sus hospedadores y del medio ambiente en el que habitan y se relacionan. Las enfermedades transmitidas por garrapatas son particularmente sensibles a las presiones ambientales que contribuyen a los cambios en su ecología y su expansión, tanto espacial como temporal, apareciendo a medida que las condiciones sean favorables, no pudiendo considerarse enfermedades estáticas. Por tanto, en la emergencia o re-emergencia de muchos de estos patógenos se considera que juegan un papel clave los cambios climáticos, favoreciendo el incremento de la temperatura media anual, con inviernos más suaves, la abundancia y prolongación de los períodos de actividad de las garrapatas vectores y las dinámicas de transmisión de los patógenos.

Asimismo, los cambios del paisaje y de su uso por parte del hombre, con la fragmentación del hábitat, la urbanización y reforestación, parecen influir de forma decisiva en la distribución de estas enfermedades, ya que puede verse favorecida o dificultada esa relación necesaria entre patógenos, vectores e individuos susceptibles, bien de forma directa o bien por la disminución de la diversidad y abundancia de fauna y flora. Finalmente, los movimientos y manejo de especies animales, productivas y cinegéticas, así como los viajes internacionales del hombre y animales domésticos y las migraciones de aves, parecen influir en la distribución de garrapatas y patógenos que transmiten.

Estos patógenos tienen una importante repercusión en la salud de los bovinos, siendo causantes de enfermedad de diferente gravedad, lo que origina grandes pérdidas económicas derivadas tanto de la muerte de animales enfermos y de su tratamiento, como de su prevención y, de manera muy notable, por su efecto en la productividad. Entre las enfermedades transmitidas por garrapatas, las anaplasmosis y piroplasmosis del ganado vacuno, objeto de este trabajo de investigación, son las más



importantes a nivel mundial. Si se tiene en cuenta que actualmente alrededor de una sexta parte de los bovinos se considera en riesgo debido a la theileriosis causada por *Theileria annulata*, es fácil comprender el efecto que estas enfermedades puede tener sobre la economía global y local, por la importancia que tiene el ganado en las zonas rurales.

A la repercusión sobre la salud animal y la productividad ganadera se une el hecho de que el espectro de acción de muchos de estos patógenos alcanza al ser humano, son agentes zoonóticos, y, por tanto, existe un creciente interés en la comprensión de estas enfermedades en relación a la salud pública y se enfatiza la importancia del concepto *One Health* para unificar los esfuerzos desde un enfoque interdisciplinario.

Desde que los agentes causantes de anaplasmosis y piroplasmosis se descubrieron a finales del siglo XIX y principios del XX, son muchas las investigaciones llevadas a cabo para tratar de conocer su secuencia de ADN, su encuadre taxonómico, su epidemiología y su patogenia, así como para tratar de establecer protocolos terapéuticos a la vez eficaces y seguros para el animal y para el consumidor. Asimismo, cobran especial importancia los trabajos llevados a cabo con el objetivo de desarrollar estrategias preventivas y de control de las enfermedades transmitidas por garrapatas en el ganado vacuno, que engloban tanto el desarrollo de vacunas que potencien en el bovino una respuesta inmunitaria específica y eficaz frente a estos agentes, como el establecimiento de planes de lucha contra los vectores de estos patógenos, las garrapatas, que comienzan a mostrar resistencias frente a los tratamientos antiparasitarios más empleados en la actualidad.

Sin embargo, a pesar de todos estos esfuerzos investigadores, la importancia de estos agentes transmitidos por garrapatas a nivel mundial y local para el ganado vacuno y la salud pública continúa creciendo, y en nuestro país, los veterinarios clínicos se enfrentan a diario con las enfermedades causadas por ellos, enfermedades a las que el ganado vacuno en extensivo y semiextensivo está especialmente expuesto, pero cuya incidencia, al no ser enfermedades de declaración obligatoria, es desconocida en numerosas regiones de España. A esto hay que añadir que estos agentes pueden mantenerse en el hospedador vertebrado de manera asintomática, con lo que actúan como portadores y son, por tanto, un reservorio para futuras infecciones. Esto hace que adquiera una gran importancia la determinación de su prevalencia mediante métodos moleculares capaces de detectar su existencia tanto en animales que presenten signos clínicos como en aquellos aparentemente sanos, lo que permitirá conocer el estado de

la ganadería en una región en concreto y, por tanto, tomar decisiones encaminadas al control de estos agentes.

### 3.2. OBJETIVOS

A pesar de que los veterinarios clínicos de la zona centro de España describen la frecuente presencia de casos clínicos de anaplasmosis o piroplasmosis en el ganado vacuno que permanece de forma permanente o temporal en pastos, no se dispone de datos actuales de estas enfermedades en la población de bóvidos de la región. Este hecho llevó al inicio de este trabajo de investigación a plantearse como **objetivo general** la determinación de la importancia epidemiológica de las anaplasmosis causadas por *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma marginale* y *Anaplasma centrale*; de las babesiosis causadas por *Babesia bigemina* y *Babesia divergens*; así como de la theileriosis causada por *Theileria annulata* en ganado vacuno en extensivo y semiextensivo de la Comunidad de Madrid.

Para ello, se plantearon como **objetivos específicos** de este trabajo de tesis doctoral los siguientes:

- Determinar la prevalencia molecular mediante la PCR de *A. phagocytophilum*, *A. marginale*, *A. centrale*, *B. bigemina*, *B. divergens* y *T. annulata* en una muestra representativa de bovinos de la Comunidad de Madrid con manejo en extensivo.
- Evaluar la posible existencia de concurrencias entre varios de los agentes incluidos en el estudio en la muestra poblacional analizada.
- Caracterizar la distribución geográfica de estos agentes en el ganado vacuno en extensivo y semiextensivo de la Comunidad de Madrid en base a las zonas climáticas definidas según la altitud, la temperatura media anual y la precipitación media anual.
- Establecer la posible asociación entre la presencia de estos agentes en sangre periférica en los animales incluidos en el estudio y las diferentes variables epidemiológicas recogidas.
- Analizar la posible influencia de la infección causada por estos agentes sobre diferentes parámetros de la analítica sanguínea analizados en los animales incluidos en el estudio.



## 4. MATERIALES Y MÉTODOS



## 4.1. ANIMALES

### 4.1.1. DELIMITACIÓN GEOGRÁFICA DE LAS ZONAS DE ESTUDIO

La zona de estudio se limita a la Comunidad de Madrid, que ocupa 8.030,1 km<sup>2</sup> y que se encuentra situada en el interior de la península ibérica, en la Meseta Central, entre las coordenadas 39,82 y 41,30 de latitud y -2,91 y -4,70 de longitud. En esta tesis doctoral fue necesario conocer cómo se distribuye el ganado bovino en la Comunidad de Madrid y establecer una organización del territorio planteada desde el punto de vista de la epidemiología de las garrapatas que transmiten los agentes. Atendiendo a esta premisa, el clima y la vegetación (que a su vez depende del clima), son los principales factores que afectan a la distribución de las garrapatas (Estrada-Peña, 2001) y, por tanto, también a las enfermedades que transmiten. Por todo ello, se decidió establecer la división de la Comunidad de Madrid en función del clima.

Tal y como se ha descrito brevemente en el apartado de Revisión Bibliográfica de esta tesis doctoral, en Madrid el clima es mediterráneo, con variaciones que dependen principalmente de la altitud. Hay un área de clima de montaña y un área de clima mediterráneo continentalizado con dos subtipos. El clima de montaña es propio, por lo general, de las zonas situadas a más de 1.200 metros de altitud que se caracterizan por una temperatura media anual que oscila entre los 3 y los 10°C y una precipitación media anual que oscila entre los 900 y casi 2.000 mm, que se presenta en forma de lluvia en primavera y verano y de nieve en invierno y otoño. El clima mediterráneo continentalizado puede subdividirse en dos tipos en función de la altitud:

- Clima mediterráneo continentalizado con veranos frescos: con una altitud, en general, de entre 800 y 1.000 m, una temperatura media anual entre 10 y 13°C y unas precipitaciones medias anuales entre 600 y 900 mm.
- Clima mediterráneo continentalizado con veranos cálidos: de forma general incluye zonas con una altitud inferior a 800 m, una temperatura media anual superior a 13°C y unas precipitaciones medias entre los 400 y 600 mm al año.
- 

Estos datos se encuentran recogidos en el “Atlas. El Medio Ambiente en la Comunidad de Madrid” editado por la Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio de la Comunidad de Madrid (Consejería de Medio Ambiente, Administración Local y Ordenación del Territorio, 2007) (**Imágenes 2 a 4**).

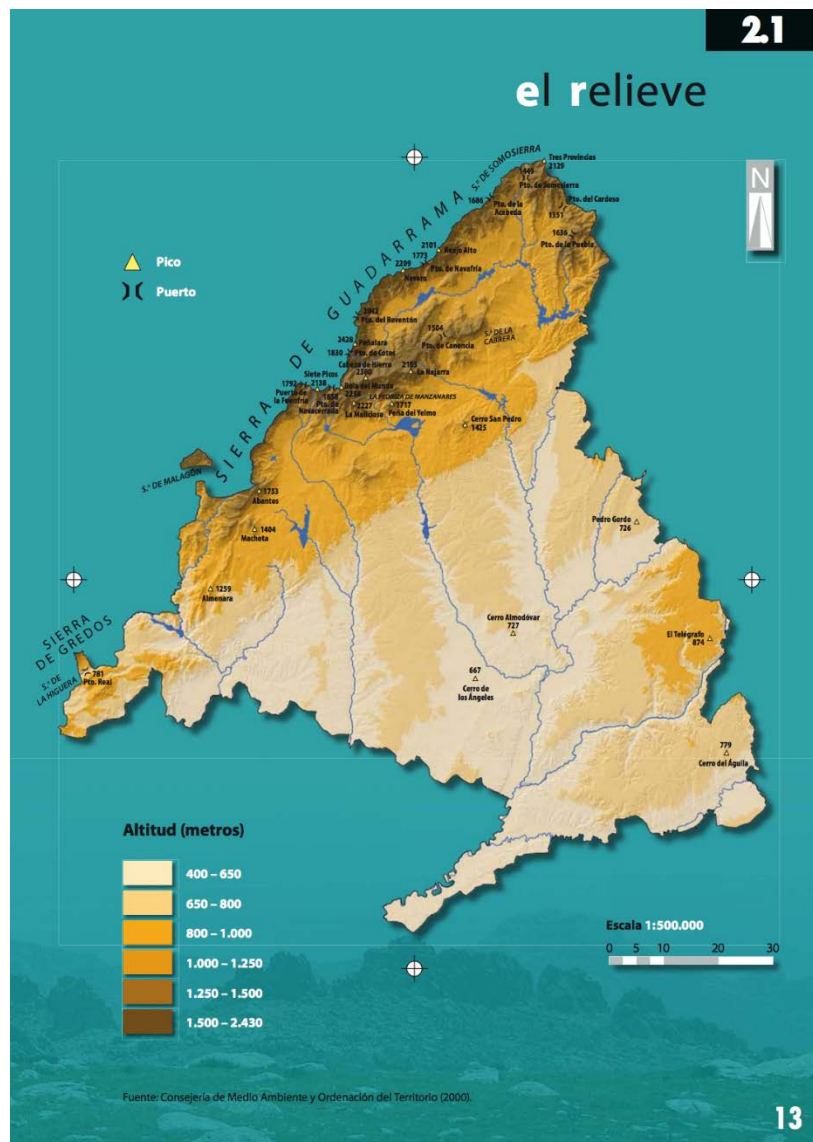


Imagen 2. Mapa de relieve del “Atlas. El Medio Ambiente en la Comunidad de Madrid”

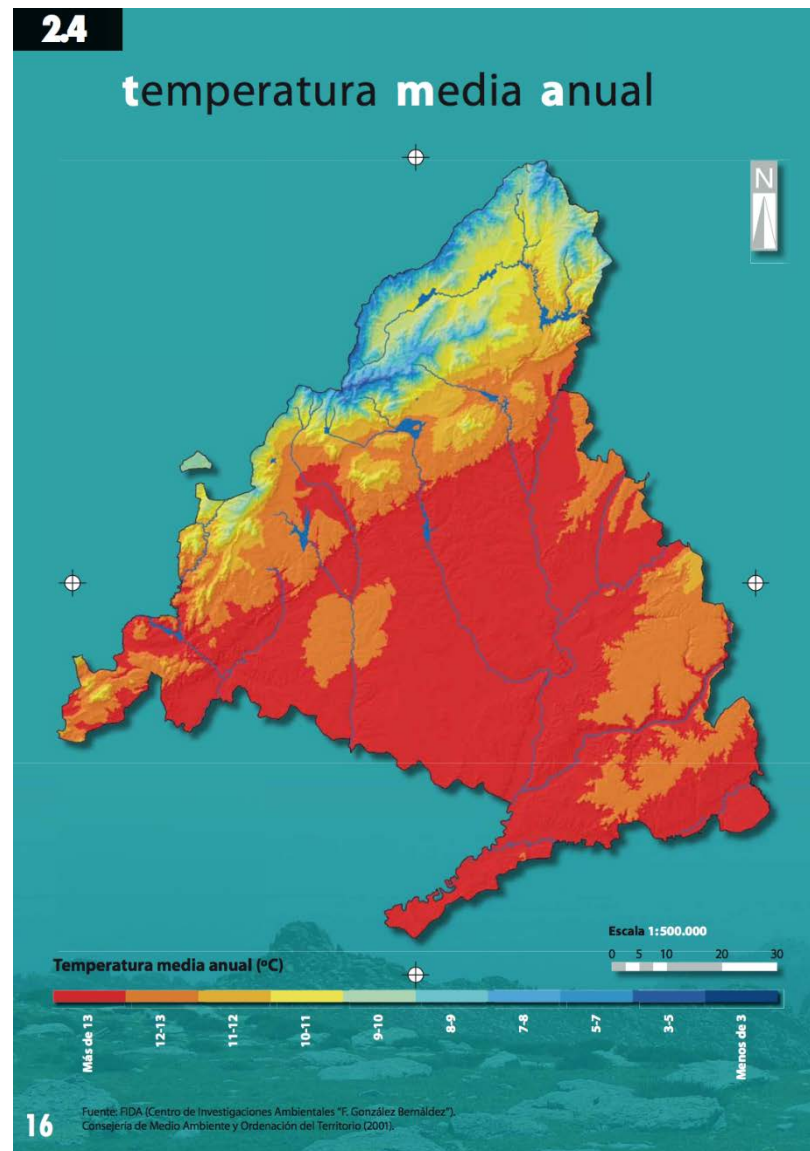


Imagen 3. Mapa de temperatura media anual del “Atlas. El Medio Ambiente en la Comunidad de Madrid”



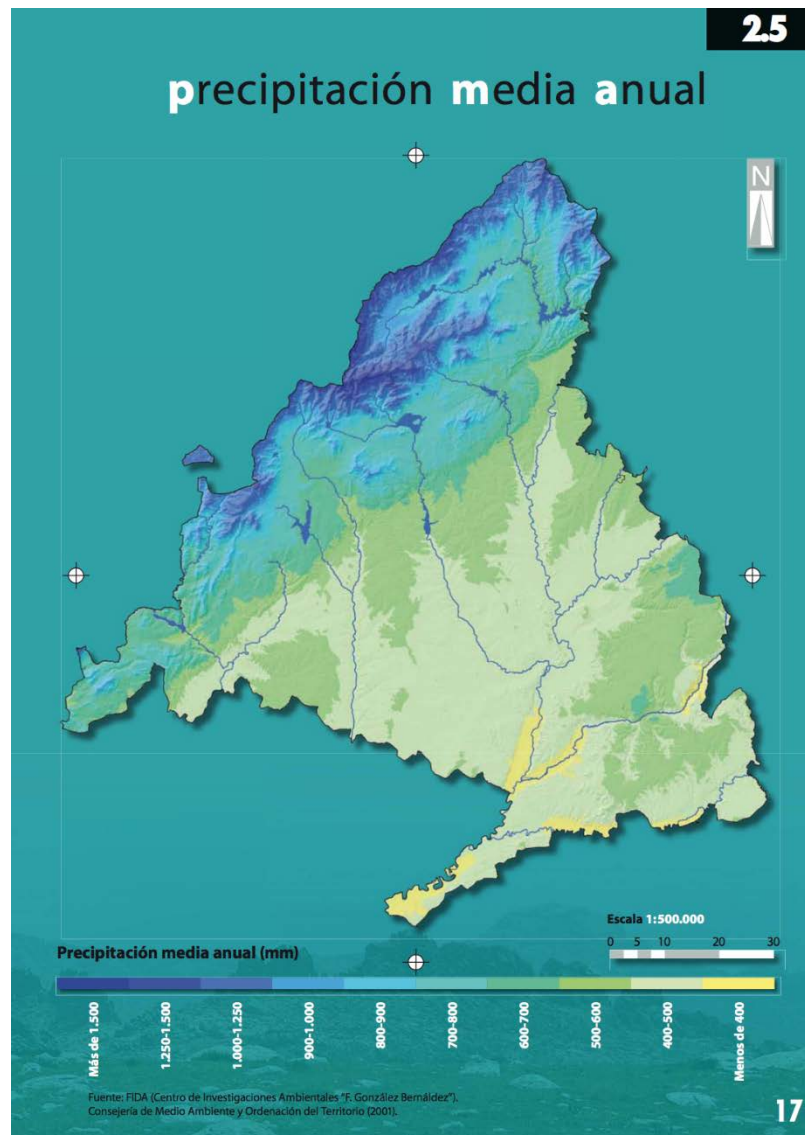


Imagen 4. Mapa de precipitación media anual del “Atlas. El Medio Ambiente en la Comunidad de Madrid”

Así, se establece la división de la Comunidad de Madrid en tres zonas en base a estos tres climas. Estas zonas son:

- M, para el clima de montaña
- F, para el clima mediterráneo continentalizado con veranos frescos
- C, para el clima mediterráneo continentalizado con veranos cálidos

Junto a estos mapas se utilizó un mapa político con los municipios de la Comunidad de Madrid de la página web [madrid.org](http://madrid.org) (Comunidad de Madrid, 2014), para establecer en qué zonas se encontraban los municipios y, de esta forma, agruparlos para dividir la población de ganado (**Imagen 5**).



Imagen 5. Mapa político de la Comunidad de Madrid

Utilizando el programa de Microsoft® PowerPoint para Mac (2011) se hizo una superposición de mapas para establecer un mapa de trabajo simplificado y poder determinar en qué zonas se encontraban los municipios. Esta información se recoge más adelante en el apartado “5.1.1. Delimitación de las zonas del estudio” de la parte de resultados de este trabajo.

Sin embargo, es importante tener en cuenta que el clima en la Comunidad de Madrid depende principalmente de la altitud, lo que conlleva que las zonas climáticas vengan definidas precisamente por este dato. Dado que los municipios, especialmente los de mayor extensión, incluyen terrenos a diferentes altitudes, en algunos casos fue necesario realizar la clasificación final de los municipios en base a la altitud medida con la aplicación “Altitud”, como se describirá en el apartado “4.2. Recogida de datos” de esta tesis, en el momento en que se tomaron las muestras en la granja, de forma que, en los casos de granjas o municipios cercanos a los límites entre zonas, fue necesario considerar que se encontraban en la zona M si la altitud era mayor a 1.200 m, F si se encontraba entre 800 y 1.000 m y C si era inferior a 800 m.

#### **4.1.2. SELECCIÓN DE LA MUESTRA**

En primer lugar, fue necesario conocer la población de ganado bovino en extensivo y su distribución en la Comunidad de Madrid para poder establecer el número de muestras objetivo o tamaño muestral, de manera que fuera representativo de la población total de esta región, así como el reparto de esas muestras en las zonas establecidas, de manera que se ajustaran a la distribución real de los animales.

Para ello, se recopiló toda la información disponible sobre la población de ganado bovino en extensivo que se encontraba en la Comunidad de Madrid con el fin de conocer la distribución de dicha población. Como fuentes de información se utilizaron los datos recogidos por el Instituto Nacional de Estadística (INE, 2009), los datos publicados en las “Encuestas Ganaderas” sobre el ganado bovino publicadas en mayo y noviembre de 2014 por el Ministerios de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (MAPAMA) y el “Estudio del Sector Español de Vacas Nodrizas” realizado por el Sistema Integral de Trazabilidad Animal (SITRAN) publicado en octubre de 2014.

En la página web del INE, a través del sistema avanzado de consultas, en la sección de “Censo Agrario de 2009” (últimos datos recogidos en esta base de datos), en el apartado de resultados de “Agricultura y medio ambiente”, se creó una tabla con el tipo de ganadería y la Comunidad de Madrid. Se seleccionó como unidad de medida “número de animales”, en las filas se tomaron las categorías “provincia”, “comarca” y “municipio”, y en las columnas se seleccionó el “tipo de ganadería: ganado por especies” y “detalle del ganado”. Gracias a esta consulta, se generó una tabla con todos los municipios de Madrid y el número de ganado bovino en cada uno de los municipios. Utilizando el programa de Microsoft® Excel para Mac (2011) se hizo un tratamiento de los datos a través de la agrupación de los municipios en cada una de las zonas creadas en el punto anterior. A la hora de elaborar esta tabla, se tuvo en cuenta que los datos del INE son de 2009, y están ordenados como “vacas lecheras”, “otras vacas” y “otros bovinos” que se clasifican según la edad y el sexo. Por lo tanto, no es posible saber los animales que se encuentran en condiciones de extensivo estrictamente, pero ninguna otra base de datos proporciona información de número de animales clasificados por municipio, ya que los datos publicados en las “Encuestas Ganaderas” y el “Estudio del Sector Español de Vacas Nodrizas”, aunque más actualizados, por ser de 2014, solo aportan el número total de ganado bovino por provincia y Comunidad Autónoma. En el caso de los datos registrados en las “Encuestas Ganaderas” se ofrece información sobre edad y sexo de los animales y se especifica si se trata de animales para sacrificio (cebo en intensivo en su mayoría) o vacas lecheras, así como los datos registrados en el “Estudio del Sector Español de Vacas Nodrizas”, documento que trata las vacas nodrizas, hembras mayores de 24 meses y menores de 14 años que no pertenecen a razas de aptitud típicamente lechera, de toda España. Así, se eliminaron del censo del INE las “vacas lecheras” y de las “Encuestas Ganaderas” los animales para sacrificio y las vacas lecheras.

Gracias a todos estos recursos pudimos disponer de unos datos aproximados sobre la población total de ganado mantenido en condiciones de extensivo en Madrid (75.699 bovinos), distribuidos en las zonas climáticas establecidas en el punto anterior, que se muestran en la siguiente tabla (**Tabla 2**).

<b>Zona</b>	<b>Población</b>	<b>Porcentaje</b>
<b>M</b>	13.904	18,4
<b>F</b>	38.090	50,3
<b>C</b>	23.705	31,3
<b>Total</b>	75.699	100

Tabla 2. Distribución de la población de ganado vacuno en extensivo de la Comunidad de Madrid según las zonas climáticas establecidas

Tras la recopilación de toda esta información y para poder determinar un tamaño de muestra representativo con una correcta distribución, se solicitó el apoyo del “Departamento de Ayuda a la Investigación, Área de Informática y Comunicaciones” de la Universidad Complutense de Madrid. Así, para el cálculo del tamaño de la muestra se ajustó para una población finita y se consideró una prevalencia esperada del 50% con un intervalo de confianza del 95% y un error estadístico del 5% con el objetivo de recoger el número máximo de muestras, que fue necesario ampliar dado el número esperado de comparaciones estadísticas que se iban a realizar.

Para mantener la relación entre el tamaño de granja y el número de muestras a recoger en cada una, se estableció la inclusión en este estudio del 25% del censo total de animales que hubiera en cada granja en el momento del muestreo.

#### **4.1.3. CRITERIO DE SELECCIÓN DE ANIMALES**

Dentro de cada granja, las muestras se recolectaron al azar, considerando el porcentaje del 25% previamente mencionado para determinar el número de animales a muestrear. El criterio principal empleado para incluir a los animales fue que se encontraran en la Comunidad de Madrid en condiciones de extensivo. Para ello, se contó con la ayuda de los equipos clínicos veterinarios de vacuno que trabajan en Madrid. Concretamente, estos equipos fueron Trialvet Asesoría e Investigación Veterinaria S.L., Vet-Rumen, Monge Veterinarios S.L.P., Javier Blanco y Asociados Servicios Veterinarios S.L., La Tejera Servicios Veterinarios S.L.P., Sergio Santos y Marchesi Hercules de Solas Adolfo Clínica Veterinaria Fresnedillas.

## 4.2. RECOGIDA DE DATOS

---

En base a la revisión bibliográfica efectuada, se recogieron, por su posible importancia epidemiológica en las enfermedades de transmisión vectorial del bovino, los siguientes datos:

- Características o reseña de los animales muestreados: raza, sexo y edad
- Características geográficas de las granjas muestreadas: se incluyeron los registros de datos geográficos del municipio y la altitud a la que se encontraron las explotaciones, para clasificarlas en una zona climática.
- Datos sobre el momento en que se recogieron las muestras: se registraron el mes, la estación del año, la temperatura y la humedad relativa.
- Características del sistema productivo de las granjas estudiadas: en este sentido, se recogió información referente a la densidad de animales por hectárea, el manejo de la reposición (mediante la introducción de animales de otras ganaderías). Asimismo, se incidió en si los animales compartían o no pastos con otros rebaños de ganado vacuno.
- Historial registrado de enfermedades transmitidas por garrapatas en la granja, exposición a garrapatas y métodos de control empleados frente a ellas y otros ectoparásitos: se recogió información relacionada con el historial de exposición a vectores artrópodos y la presencia de garrapatas en el momento de la toma de muestras, así como con el tipo de fármacos antiparasitarios empleados y el número de tratamientos realizados al año. Asimismo, se incidió en el historial de enfermedades de transmisión vectorial diagnosticadas en la granja.
- Contacto con animales de otras especies: se recogieron datos relacionados con el posible contacto de los animales con otras especies, tanto domésticas como silvestres.

Para facilitar una recogida de datos homogénea, se diseñaron tres encuestas que se completaron con los datos de cada animal gracias a que los veterinarios clínicos de la explotación o los responsables del saneamiento ganadero en cada caso facilitaron las “Fichas de Establo” de cada granja, documentos oficiales de la Dirección General de Agricultura y Ganadería, Consejería de Medio Ambiente, Administración Local y Ordenación del Territorio de la Comunidad de Madrid, donde se incluyen la raza, el sexo y la fecha de nacimiento de todos los animales de la explotación. Todas las encuestas se hicieron después de cada muestreo.

La primera encuesta, llamada “Cuestionario Ganadero” (**Imagen 6**), se dirigió al ganadero o cuidador de los animales, y en ella se incluyeron datos relacionados con la granja y el manejo de los animales.

Fecha:

Nº granja:

### Cuestionario Ganadero

- **Nombre ganadería y código postal:**
- **Localización, municipio:**
- **Tipo de ganado:**
- **Introducción de animales (sementales, novillas...), procedencia y cuando:**
- **Tipo/sistema de explotación:**
- **Uso de pastos propios/compartidos:**
- **Densidad animal/hectárea:**
- **Ganado vecino (tipo, garrapatas...):**
- **Otros animales de la explotación con garrapatas (perros, caballos...):**
- **Presencia/Ausencia de Garrapatas momento toma muestras**
- **Historia previa de garrapatas:**
- **Desparasitaciones (frecuencia, última fecha, producto):**
- **Programa vacunal:**
- **Tratamientos específicos a terneros (generales, cuando se ponen malos...):**
- **Fauna autóctona de la zona:**
- **Casos previos de animales muertos con anemia, ictericia, hemoglobinuria...**

Imagen 6. Encuesta dirigida a los ganaderos, “Cuestionario Ganadero”

La segunda encuesta estuvo dirigida al veterinario que atendía dicha explotación a través del “Cuestionario Veterinario” (**Imagen 7**). En este caso se pretendió recoger información sobre el historial de enfermedades vectoriales en la ganadería y los programas antiparasitarios que se aplicaban, además de poder tener una visión más global sobre las enfermedades transmitidas por garrapatas en la zona.

Fecha:	Nº granja:
<b>Cuestionario Veterinario</b>	
<ul style="list-style-type: none"><li>- <b>Nombre y e-mail:</b></li><li>- <b>Nombre de la ganadería que atiende:</b></li><li>- <b>Localización, municipio:</b></li><li>- <b>Historia previa de garrapatas de la explotación y en la zona:</b></li><li>- <b>Desparasitaciones que recomienda en la ganadería (frecuencia, intervalo entre desparasitaciones y producto):</b></li><li>- <b>Programa vacunal:</b></li><li>- <b>Uso de tetraciclinas u otros para tratar terneros o vacas:</b></li><li>- <b>Fauna autóctona de la zona:</b></li><li>- <b>Otros animales en la explotación/zona con garrapatas (perros, caballos...)</b></li><li>- <b>Casos previos de animales muertos con anemia, ictericia, hemoglobinuria...</b></li><li>- <b>Análisis de estos casos: ¿necropsia? ¿tratamiento? ¿resultados de la toma de muestras?</b></li><li>- <b>Historia previa de babesia/theileria/anaplasma en esta explotación y en la zona</b></li></ul>	

Imagen 7. Encuesta dirigida a los veterinarios, “Cuestionario Veterinario”

Por último, se llevó a cabo una tercera encuesta, llamada “Cuestionario de Muestreo” (**Imagen 8**), a modo de registro propio de datos relacionados con la

distribución de las granjas y la toma de muestras como tal. En esta encuesta se apuntaron las mediciones de temperatura, humedad relativa y altitud mediante diferentes aplicaciones móviles. La aplicación para móviles utilizada para medir la altitud a la que se situaban las granjas fue “Altitude” (PyGDroid, 2010), para establecer las coordenadas donde se localizaba la granja se usó la aplicación “Mis Coordenadas GPS” y para registrar la temperatura y la humedad relativa se utilizó “WeatherPro” (MeteoGroup, 2010, GPS Tools PEGI 3, 2015).

Fecha:	Nº granja:
<b>Cuestionario Muestreo</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- <b>Nombre de la ganadería:</b></li> <li>- <b>Fecha y hora de extracción:</b></li> <li>- <b>Temperatura y humedad:</b></li> <li>- <b>Altitud:</b></li> <li>- <b>Coordenadas GPS:</b></li> <li>- <b>Localización, municipio:</b></li> <li>- <b>Tipo de vegetación:</b></li> <li>- <b>Presencia/ausencia de garrapatas en el momento de la toma de muestras</b></li> <li>- <b>Garrapatas: ninguna, pocas (1-20), moderadas (21-50) y abundantes (&gt;51)</b></li> <li>- <b>Sexo/Edad/Raza de los animales:</b></li> <li>- <b>Aspecto general de los animales:</b></li> <li>- <b>Fauna autóctona de la zona:</b></li> <li>- <b>Otros animales en la explotación (perros):</b></li> <li>- <b>Motivo de la extracción (saneamiento, reproducción, vacunación...)</b></li> <li>- <b>Personas que me acompañan:</b></li> </ul>	

Imagen 8. Encuesta propia, “Cuestionario de muestreo”



### **4.3. TOMA DE MUESTRAS**

---

Las muestras se tomaron entre abril y octubre de 2015 aprovechando la Campaña de Saneamiento Ganadero, en la cual se toman muestras de sangre de todos los animales mayores de un año de la explotación, pero en algunos casos también se tomaron muestras de animales menores de un año. La toma de muestra se realizó con la ayuda de los equipos clínicos veterinarios de vacuno anteriormente citados que trabajan en la Comunidad de Madrid. En todos los casos se contó con el consentimiento informado de los propietarios de las ganaderías para la recogida de muestras y datos de sus animales y del entorno donde se encontraba la explotación. Igualmente, el estudio contó con el informe favorable del Comité de Ética de Experimentación Animal (CEEa) del Hospital Clínico Veterinario Complutense de la Universidad Complutense de Madrid.

De cada animal se obtuvo sangre a partir de la vena coccígea en tubos secos no siliconados de 5 ml (BD Vacutainer®) para las determinaciones en suero de la bioquímica sanguínea y en tubos estériles de 4 ml con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) (BD Vacutainer®) para llevar a cabo el análisis hematológico y la extracción de ADN para su posterior procesamiento mediante PCR, tal y como se describirá más adelante en este apartado de Materiales y Métodos.

Tras su recogida, las muestras se mantuvieron en refrigeración hasta ser procesadas en las instalaciones del Hospital Clínico Veterinario Complutense (HCVC), donde se obtuvieron dos alícuotas de 1 ml a partir del tubo de EDTA. Una de estas alícuotas y el tubo sin anticoagulante fueron empleadas para la realización de la hematología y la bioquímica sanguíneas. La segunda alícuota de sangre con el anticoagulante EDTA se mantuvo en congelación a -20°C hasta su posterior extracción de ADN para la realización de pruebas moleculares.

En el siguiente apartado “4.4. Análisis laboratoriales” de esta memoria de tesis doctoral, se procederá a describir cada una de las técnicas laboratoriales empleadas para la realización de este estudio.

### **4.4. ANÁLISIS LABORATORIALES**

---

Se realizó PCR frente a los agentes patógenos de interés en el estudio (*Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma marginale*, *Anaplasma centrale*, *Babesia*

*bigemina*, *Babesia divergens* y *Theileria annulata*) a partir de las muestras obtenidas de cada animal.

A continuación se detallará el protocolo empleado en el procesamiento de las muestras en cada caso.

#### **4.4.1. ANALÍTICA SANGUÍNEA**

Como se ha comentado anteriormente, se realizó un hemograma completo a partir de la alícuota de 1 ml de los tubos de EDTA y un análisis bioquímico básico del suero recogido a partir de los tubos sin anticoagulante.

El hemograma se realizó empleando el autoanalizador ADVIA® 120 (Siemens Healthcare Diagnosis, Barcelona, España) y, por medio de un programa informático preparado para el análisis en distintas especies de mamíferos, para ganado bovino en este caso, se determinaron los siguientes parámetros hematológicos: recuento de hematíes, hemoglobina, hematocrito, volumen corpuscular medio (VCM), hemoglobina corpuscular media (HCM), concentración de hemoglobina corpuscular media (CHCM), recuento de leucocitos, fórmula leucocitaria y recuento de plaquetas.

Los parámetros bioquímicos se determinaron mediante un espectrofotómetro, el autoanalizador automático secuencial KONE (Kemia Científica) con reactivos que cumplen las condiciones que exige la Sociedad Española de Química Clínica. En este análisis bioquímico se incluyeron las enzimas hepáticas AST, ALT y las proteínas totales.

Los valores de referencia hematológicos y bioquímicos empleados se exponen en la siguiente **Tabla 3**:

<b>PARÁMETROS HEMATOLÓGICOS</b>	<b>RANGO DE REFERENCIA</b>
Glóbulos Rojos x 10 <sup>6</sup> /μl	5 - 10
Hemoglobina (g/dl)	8 - 15
Hematocrito (%)	24 - 46
VCM (fl)	40 - 60
HCM (pg)	14 - 18
CHCM (g/dl)	36 - 39
Leucocitos x 10 <sup>3</sup> /μl	4 - 12
Neutrófilos x 10 <sup>3</sup> /μl	0,6 - 4

Linfocitos x 10 <sup>3</sup> /μl	2,5 - 7,5
Monocitos x 10 <sup>3</sup> /μl	0,025 - 0,84
Eosinófilos x 10 <sup>3</sup> /μl	0 - 2,4
Basófilos x 10 <sup>3</sup> /μl	0 - 0,2
Plaquetas x 10 <sup>3</sup> /μl	100 - 800
<b>PARÁMETROS BIOQUÍMICOS</b>	<b>RANGO DE REFERENCIA</b>
AST (U/l)	48 - 100
ALT (U/l)	17 - 37
Proteínas totales (g/dl)	5,9 - 7,7

Tabla 3. Valores de referencia del hemograma y del análisis bioquímico (Feldman y col., 2000, Meyer y Harvey, 2004, George y col., 2010)

#### **4.4.2. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)**

Cada una de las muestras obtenidas de los animales incluidos en este estudio fue analizada por métodos moleculares buscando la amplificación de ciertas regiones del ADN de agentes patógenos de los géneros *Anaplasma*, *Babesia* y *Theileria*. Concretamente, tal y como se detallará más adelante en este apartado de Materiales y Métodos de esta tesis doctoral, las PCRs empleadas eran capaces de amplificar ADN de *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma marginale*, *Anaplasma centrale*, *Babesia bigemina*, *Babesia divergens* y *Theileria annulata*.

Con el fin de minimizar las posibles contaminaciones con ADN, se realizaron los procesos de extracción de ADN, la preparación de la premezcla de los reactivos para las PCRs, el proceso de amplificación de ADN en el termociclador y la lectura del gel de agarosa en diferentes espacios físicos (Evans, 2009). Además de esta medida preventiva, se aplicaron otras acciones que se irán explicando en los siguientes puntos.

##### **4.4.2.1. Extracción de ADN**

Previamente a la PCR, fue necesario realizar la extracción de ADN de las muestras de sangre. Para ello, se utilizó el kit de extracción “UltraClean® DNA Blood Spin Kit” (Mo Bio Laboratorios, Inc., California, Estados Unidos) siguiendo el protocolo descrito por el fabricante a partir de 200 μl de las alícuotas de sangre completa en EDTA. En la extracción del ADN se limpió la encimera del laboratorio y las pipetas con el producto comercial “Termi-DNA-Tor” de Biotools para la eliminación de ADN y ARN de las superficies. Además, se emplearon puntas con filtro y pipetas solo para esta actividad, siendo distintas las utilizadas para el pipeteo de la muestra de sangre de las

utilizadas para los reactivos, y el cambio de guantes y puntas era frecuente durante el proceso. La extracción de ADN de las muestras se realizó en tandas de 24 muestras dispuestas de forma aleatoria, independientemente del orden de muestreo. El volumen final de ADN extraído fue de 200  $\mu$ l, que fueron debidamente etiquetados y almacenados en cajas independientes a -20°C hasta la realización de las PCRs.

#### **4.4.2.2. Cuantificación y calidad del ADN**

Previamente al almacenamiento a -20°C del ADN extraído, la concentración de ADN fue determinada mediante espectrofotometría empleando la tecnología Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Delaware, Estados Unidos), midiéndose la absorbancia de la luz ultravioleta a diferentes longitudes de onda: 260 nm, 230 nm y 280 nm. La lectura a 260 nm indica la concentración de ADN de la muestra, que debe estar entre 10 y 40 ng/ $\mu$ l para ser idónea para la realización posterior de PCR. La concentración de ADN fue óptima en el 92,2% de las muestras, mientras que aquellas muestras que se encontraron por encima (3%) o por debajo (4,8%) del rango se ajustaron en la preparación de la premezcla para realizar la PCR, optimizando la concentración de ADN.

La relación entre las longitudes de onda 260 nm y 280 nm hace referencia a la relación ADN/proteínas, estimando la pureza del ADN y la posible contaminación con proteínas, fenol u otros compuestos. Una relación de entre 1,6 y 2 indica que el ácido nucleico es óptimo para su utilización (Thermo Fisher Scientific, 2009).

Asimismo se analizaba la relación de la absorbancia de la luz ultravioleta a las longitudes de onda 260 nm y 230 nm. En este caso es una medida secundaria de la pureza del ácido nucleico, cuyos valores son a menudo mayores que los valores medidos en la relación anterior, 260/280, y se encuentran habitualmente en un rango entre 1,8 y 2,2. Si este ratio 260/230 es apreciablemente más bajo, podría indicar la presencia de contaminantes co-purificados (Thermo Fisher Scientific, 2009).

En todos los casos, la relación ADN/proteínas fue normal, no observándose inhibidores que pudieran influir en los resultados de la PCR.

#### **4.4.2.3. Control de la extracción de ADN**

La ausencia de inhibidores de la PCR en las muestras de ADN obtenidas se demostró realizando la amplificación de un fragmento de ADN del gen gliceraldehído-

3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) mediante PCR convencional en todas las muestras que fueron negativas a las PCRs que amplifican ADN de los agentes objeto de estudio, (Birkenheuer y col., 2003, Devos y Geysen, 2004, Díaz-Regañón y col., 2017). Este gen de mantenimiento celular o *housekeeping* es uno de los más comúnmente utilizados. Codifica para una enzima que es esencial en la glicólisis que se expresa en la mayoría de las células, al ser necesario para la fisiología y funcionamiento celular. La expresión del gen GAPDH se ha empleado como marcador al permanecer constante en las células, considerándose un gen de mantenimiento celular invariable (Dveksler y col., 1992, Barber y col., 2005). Las condiciones exactas de la reacción se detallan en el apartado de “Procesado de las muestras mediante PCR”.

En todos los casos, los resultados obtenidos en la amplificación mediante PCR para *housekeeping* fueron favorables, con lo que en todas nuestras muestras existió ADN potencialmente amplificable y sin presencia de inhibidores de la PCR.

#### **4.4.2.4. Procesado de las muestras mediante PCR**

Una vez extraído el ADN y comprobado que tanto su cantidad como su calidad fueron adecuadas y que no existieron inhibidores de la reacción en las muestras, cada una de ellas fue sometida a un análisis mediante PCR para la detección de ADN de *A. phagocytophilum*, *A. marginale*, *A. centrale*, *B. bigemina*, *B. divergens* y *T. annulata*, tal y como se describirá a continuación.

Para ello, se mezclaron todos los reactivos en forma de premezcla, para posteriormente repartirlo en cada uno de los tubos independientes, a los que posteriormente se añadió el ADN de las muestras ordenadas de forma aleatoria, de manera que no coincidieron con el orden de muestreo ni con el orden de la extracción de ADN, así como los controles negativos y positivos en cada caso. Este proceso fue llevado a cabo en una cabina de flujo laminar. Las muestras de ADN, los controles positivos y negativos y los reactivos para la preparación de la premezcla no compartieron espacio, ni de almacenamiento, ni en el momento de la preparación. Además, en la preparación de la premezcla, el pipeteo del ADN fue el último paso y se emplearon puntas con filtro y pipetas distintas a las utilizadas para los reactivos. El control positivo se mantuvo siempre fuera de la cabina y solo se introdujo en la misma en el momento de su uso. Cada cierta cantidad de muestras, y en función de la cantidad preparada, se incluyó un control negativo como control de la reacción que consistió en agua estéril para inyectable de Braun® que fue alicuotada y autoclavada (Evans, 2009).

Además de las medidas preventivas ya comentadas para disminuir el riesgo de contaminación, todos los utensilios plásticos y los tubos para PCR empleados fueron autoclavados, se usó Halamid® como método de descontaminación tanto para las gradillas empleadas en la preparación de la mezcla para la realización de la PCR, mediante su inmersión durante un mínimo de 30 minutos, como durante el trabajo realizado en la cabina de flujo laminar, donde también se empleó luz ultravioleta, guantes de nitrilo que se desinfectaron con Halamid® y se sustituyeron con regularidad y se usó ropa de laboratorio distinta para cada actividad (Evans, 2009).

Las muestras fueron analizadas mediante el empleo de PCR convencional, salvo en el caso de *B. divergens* donde se utilizó una PCR anidada o *nested*. Se emplearon en todos los casos cebadores o *primers* específicos de especie capaces de amplificar ADN de *A. phagocytophilum*, *A. marginale*, *A. centrale*, *B. bigemina*, *B. divergens* y *T. annulata*.

Para todos los casos se emplearon los termocicladores Mastercycler® ep Gradient o Mastercycler® Personal (Eppendorf, Alemania).

El protocolo de PCR empleado para la amplificación del gen GAPDH ya estaba estandarizado en nuestro laboratorio (Ayllón y col., 2012, Díaz-Regañón y col., 2017), pero en otros casos fue necesaria la puesta a punto de la técnica a partir de los protocolos presentes en la bibliografía.

A continuación se describen en detalle los cebadores empleados en cada caso, la preparación de los reactivos para la premezcla, los ciclos empleados y su lectura en gel de electroforesis.

#### ○ Cebadores

- Los cebadores para la amplificación del gen de referencia o *housekeeping* GAPDH, empleados para el control de la extracción, fueron GAPDH-1 (5' CCT TCA TTG ACC TCA ACT ACA T 3') y GAPDH-2 (5' CCA AAG TTG TCA TGG ATG ACC 3') con un tamaño de producto esperado de 282 pb (Birkenheuer y col., 2003).
- En la PCR de *A. phagocytophilum* se usaron los cebadores que amplifican el gen *msp2*, que genera diversidad proteica en la membrana externa para establecer infecciones persistentes en los hospedadores y puede estar implicado en la invasión de neutrófilos (Zeidner y col., 2000, Massung y Slater, 2003). Estos cebadores son: *msp2*-3f (5'CCA GCG TTT

AGC AAG ATA AGA G 3') y msp2-3r (5'GCC CAG TAA CAA CAT CAT AAG C 3'), que amplifican un fragmento de 334 pb.

- Para *A. marginale* se emplearon los cebadores 1733F (5' TGT GCT TAT GGC AGA CAT TTC C 3') y 2957R (5' AAA CCT TGT AGC CCC AAC TTA TCC 3'), que amplifican el gen *msp1α*, dentro de las regiones conservadas que flanquean las secuencias repetidas, que codifica la proteína MSP1a, una adhesina para eritrocitos bovinos y células de garrapatas, indispensable para la invasión de células y la transmisión de *A. marginale*. Los productos amplificados de esta PCR oscilan entre 630 y 1190 pb, que representan de una a ocho repeticiones internas, y en algunos casos se observan dobles bandas, lo que probablemente se debe, según los autores, a múltiples genotipos dentro de la misma muestra (de la Fuente, García-García, Blouin, McEwen y col., 2001, Lew y col., 2002, Vidotto y col., 2006).
- Para *A. centrale* se emplearon los cebadores msp4-f (5' CAT GGG GCA TGA ATC TGT G 3') y msp4-r (5' AAT TGG TTG CAG TGA GCG C 3') que amplifican el gen *msp4* específico de *A. centrale*, que codifica la proteína MSP4 altamente conservada, con una función desconocida. El fragmento esperado es de 395 pb (Shkap y col., 2008, Battilani y col., 2017).
- Para *B. bigemina* se emplearon los cebadores BIG1\_F (5' AGA GTG AAA ATG GCG AAC TCG C 3') y BIG2\_R (5' TTA CGA CGA TCG TTT GAA GTA C 3') que tienen como diana parte del gen de la proteína asociada a la roptria 1c (*rap1c*), localizado en el locus del gen *rap1*, caracterizado por su expresión en los merozoítos durante el proceso de invasión de eritrocitos, con un fragmento esperado de 287 pb (Hilpertshauser y col., 2007).
- En el caso de *B. divergens*, tal y como se ha comentado previamente, se realizó una PCR anidada, por lo que fue necesario emplear dos pares de cebadores. En primer lugar, se utilizaron los cebadores A\_F (5' AAC CTG GTG ATC CTG CCA GT 3') y B\_R (5' GAT CCT TCTGCA GGT TCA CCT AC 3'), cuya diana es un fragmento del gen ARN ribosómico de la subunidad pequeña (SSU ARNr). El segundo par de cebadores utilizados fue: srBdvF (5'GGT GTT AAT ATT GAC TAA TGT CGA GAT TGC 3') y srBdvR (5'CCA AGC CGA CGA ATC GGA AAG GCC 3'), que amplifican específicamente un fragmento de 1.026 pb del gen SSU ARNr que produce un producto conservado funcionalmente, con secuencias de nucleótidos específicas especie (Holman y col., 2005).

- Para la PCR de *T. annulata* se usaron los cebadores N516 (5' GTA ACC TTT AAA AAC GT 3') y N517 (5' GTT ACG AAC ATG GGT TT 3'), cuya diana es el gen *TamS1* que codifica el antígeno de superficie principal de 30 kDa del merozoito de *T. annulata*, con un tamaño de fragmento esperado de 721 pb (d'Oliveira y col., 1995).
- Preparación de los reactivos para la premezcla
  - Para el caso del *housekeeping*, se emplearon como premezcla 4 µl de agua, 7,5 µl de la solución DNA AmpliTools HotSplit Master Mix (Biotools B&M Labs, S.A., Spain), que se compone de la enzima Biotools HotSplit DNA Polimerasa, una mezcla de dNTPs, buffer de reacción que incluye una concentración final de MgCl<sub>2</sub> de 4 mM y estabilizantes, 0,3 µl de cada cebador y 3 µl de ADN, obteniéndose un volumen final de 15 µl. Los cebadores se preparan a una concentración de 30 µM.
  - La premezcla empleada en el resto de PCRs fue la misma, con las siguientes cantidades empleadas: 7,5 µl de agua, 12,5 µl de DNA AmpliTools HotSplit Master Mix, 0,25 µl de cada cebador a la concentración adecuada en cada caso, tal y como se detallará a continuación, y 5 µl de ADN, con lo que se obtuvo un volumen final de 25 µl. Para la amplificación de las especies *A. phagocytophilum*, *B. divergens* y *T. annulata* se emplearon los cebadores a una concentración de 50 µM, y a 100 µM para *B. bigemina*. Para la amplificación de *A. marginale*, se emplearon los cebadores a una concentración de 30 µM y para la amplificación de *A. centrale* a 20 µM.

En el caso de la PCR anidada, los productos de la primera reacción se diluyeron 1:20 con agua y se utilizaron 5 µl de esta dilución como muestra problema para la segunda reacción.

○ Controles de la reacción

En todos los casos se empleaba agua como control negativo y, como control positivo, éste variaba en función del agente diana. Concretamente los controles positivos empleados fueron:

- En el caso de la PCR de *A. phagocytophilum* el control positivo procedía de Protatek International, Inc. (Minneapolis, Estados Unidos).



- En el caso de *A. marginale*, el control positivo fue cedido por los doctores Aránzazu Portillo, Ana María Palomar y José Antonio Oteo, del Centro de Investigación Biomédica de La Rioja (Logroño).
- El control positivo de ADN de *A. centrale* fue cedido por las doctoras Ana Palomar y Lesley Bell-Sakyi, responsable del *Tick Cell Biobank* del *Pirbright Institute, Institute of Infection and Global Health* en la *University of Liverpool* (Liverpool, Reino Unido).
- Los controles positivos de *B. bigemina*, *B. divergens* y *B. bovis* fueron cedidos por la doctora Ana Hurtado, del Departamento de Salud Animal de NEIKER, el Instituto Vasco de Investigación y Desarrollo Tecnológico (Derio, Bizkaia).
- El control positivo de *Theileria annulata* provenía de una muestra de sangre de un caso clínico de infección natural de un bovino que fue atendido en el Hospital Clínico Veterinario Complutense.

Para cada una de las PCRs empleadas en este estudio, se evaluó su especificidad mediante el uso de una serie de controles de ADN positivos frente a agentes diferentes al que se buscaba amplificar en la reacción en concreto. De esta manera, se comprobó la amplificación únicamente cuando se empleaba el control positivo específico en cada caso. Los controles de ADN empleados fueron los ya descritos de *A. phagocytophilum*, *A. marginale*, *A. centrale*, *B. bigemina*, *B. divergens*, *B. bovis* y *T. annulata*, así como controles de ADN de *Ehrlichia canis* y *Leishmania infantum*. En ningún caso se amplificó un fragmento distinto del fragmento objetivo de los cebadores, que eran capaces, por tanto, de amplificar únicamente ADN del agente esperado.

○ Programas

- El programa empleado para la realización de la PCR para la amplificación del gen GAPDH viene reflejado en la siguiente tabla (Birkenheuer y col., 2003) (**Tabla 4**):

-

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	95°C	1 min
	94°C	4 seg
45	57°C	4 seg
	72°C	3 seg
1	72°C	1 min

Tabla 4. Condiciones de la reacción para la PCR de *housekeeping*

- Para la amplificación del gen *msp2* de *A. phagocytophilum* se empleó el siguiente programa (Massung y Slater, 2003) (**Tabla 5**):

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	95°C	2 min
	94°C	30 seg
40	55°C	30 seg
	72°C	1 min
1	72°C	5 min

Tabla 5. Condiciones de la reacción para la PCR de *A. phagocytophilum*

- Para la amplificación del gen *msp1α* de *A. marginale* se empleó el siguiente programa (Vidotto y col., 2006) (**Tabla 6**):

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	94°C	3 min
	94°C	1 min
30	55°C	1 min
	72°C	2 min
1	72°C	7 min

Tabla 6. Condiciones de la reacción para la PCR de *A. marginale*

- El programa empleado para la amplificación del gen *msp4* de *A. centrale* fue el siguiente (Shkap y col., 2008) (**Tabla 7**):

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	95°C	3 min
	98°C	10 seg
35	55°C	30 seg
	72°C	30 seg
1	72°C	5 min

Tabla 7. Condiciones de la reacción para la PCR de *A. centrale*

- Para la amplificación de parte del gen *rap1c* de *B. bigemina* se utilizó el siguiente programa (Hilpertshauser y col., 2007) (**Tabla 8**):

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	94°C	10 min
	94°C	30 seg
40	60°C	30 seg
	72°C	30 seg
1	72°C	10 min

Tabla 8. Condiciones de la reacción para la PCR de *B. bigemina*

- Para la amplificación de *B. divergens* se empleó el siguiente programa en el caso de la primera reacción de la PCR anidada (Holman y col., 2005) (**Tabla 9**):

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	96°C	3 min
	94°C	10 seg
35	60°C	10 seg
	72°C	2 min
1	72°C	10 min

Tabla 9. Condiciones de la primera reacción para la PCR de *B. divergens*

En la segunda reacción de la PCR anidada, el programa fue el mismo que se ha descrito en la **Tabla 9**, pero el tiempo de la desnaturalización inicial fue de un minuto en lugar de tres minutos.

- Para la amplificación de *T. annulata* se usó el programa modificado de 35 ciclos, en vez de 30, según lo descrito por Almería y colaboradores (2001). El resto de las condiciones de la PCR fueron las descritas previamente por d'Oliveira y colaboradores (1995) (**Tabla 10**):

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	94°C	2 min
	94°C	1 min
35	55°C	1 min
	72°C	1 min
1	72°C	7 min

Tabla 10. Condiciones de la reacción para la PCR de *T. annulata*

El empleo de las PCR descritas, con el uso de los cebadores mencionados y con las concentraciones de reactivos y los programas indicados, han permitido estimar una sensibilidad variable según el agente de estudio. Concretamente, la sensibilidad estimada de la PCR de *A. phagocytophilum* es de un mínimo de 0,25 células infectadas/reacción o de 50 células infectadas/ml (Massung y Slater, 2003). En el caso de la PCR empleada para la detección de *A. marginale* el límite de detección que ha sido estimado a partir de diluciones seriadas del aislado de *A. marginale* en cultivo H83 (1,5 mg/ml) es de 1,5 ng de ADN (Lew y col., 2002). En cuanto a la PCR de *A. centrale*, se ha descrito la amplificación de fragmentos específicos de *A. centrale* el día 95 después de la infección de animales inoculados con  $1 \times 10^5$  eritrocitos infectados con *A. centrale*, con un límite de detección aproximado del 2% (Shkap y col., 2008). Para el caso de *B.*

*bigemina*, se ha descrito la posibilidad de amplificar ADN de este agente con el protocolo de PCR empleado en esta tesis doctoral en bovinos inoculados por vía subcutánea con  $10^7$  eritrocitos, alcanzándose parasitemias mínimas del 1% (Thompson y col., 2014). Para la PCR de *B. divergens* se ha descrito la posibilidad de detección de parasitemias de un 9% de eritrocitos infectados (Holman y col., 2005). En cuanto al límite de detección de la PCR de *T. annulata*, d'Oliveira y colaboradores describieron en 1995 un límite de detección de 15 parásitos detectados por 50  $\mu$ l de muestra, gracias a la realización de diluciones seriadas de sangre con una parasitemia del 25%.

- Lectura en gel de electroforesis

El producto amplificado fue mezclado con el tampón de carga, compuesto por azul de bromofenol al 5%, xilencyanol al 0,25% y glicerol al 30%. Tras la mezcla del producto amplificado (8  $\mu$ l) y el tampón de carga (2  $\mu$ l), la concentración final de éste fue del 10%. Este tampón tiene como función la coloración de la mezcla para su visualización en el gel y también que ésta quede en el fondo de cada pocillo.

El gel de electroforesis se obtuvo al mezclar con agarosa (Lab. Conda, España) 100 ml de una solución TAE a una concentración de 1x, preparada a partir de una solución TAE 50x (Lab. Conda Prodisa, España) que se diluía con agua destilada. En nuestro estudio se empleó una cantidad de 1 a 1,5 g de agarosa, en función del tamaño de fragmento esperado. A esta mezcla de agarosa con TAE 1x se añadieron 2  $\mu$ l de bromuro de etidio en solución con una concentración de 10 mg/ml (Sigma-Aldrich®, San Louis, Estados Unidos), que se une al ADN dando fluorescencia al exponerlo a luz ultravioleta y así se permite la lectura de los fragmentos amplificados.

En cada pocillo del gel se cargaron 10  $\mu$ l de la mezcla compuesta por el ADN amplificado y el tampón de carga. Para ello, se emplearon puntas con filtro y una pipeta utilizada solo para esta actividad, ya que la manipulación de la muestra una vez amplificada supone un alto riesgo de contaminación para el material en contacto con él.

Para determinar el tamaño de las bandas obtenidas en el gel en cada caso, se emplearon los marcadores de 100 pares de bases (Thermo Scientific GeneRuler 100pb DNA Ladder) o de 1 kilobase (Thermo Scientific GeneRuler 1 Kb DNA Ladder, *ready-to use*) en función del tamaño esperado del fragmento.

La visualización del gel para su lectura se realizó mediante el transiluminador de luz ultravioleta de Vilber Lourmat (Francia).

#### **4.4.2.5. Purificación de ADN y secuenciación**

En los casos en los que se produjo amplificación tras la realización de alguna de las PCRs de las especies patógenas evaluadas, se procedió a la purificación del producto obtenido empleando el kit de purificación “Speedtoold PCR Clean-Up” (Biotools Labs, S.A., Madrid, España), siguiendo el protocolo del fabricante para purificación directa de productos de PCR.

En la purificación del ADN se emplearon puntas con filtro y pipetas utilizadas solo para esta actividad, siendo distintas las pipetas utilizadas para el pipeteo de la muestra amplificada de las utilizadas para los reactivos. A continuación se procedió a la secuenciación automática de las muestras de interés en Secugen (campus del CSIC de la Ciudad Universitaria de Madrid), empleando el secuenciador de ADN automático ABI3100, usando el BigDye® Terminator versión 3.1 (Applied Biosystems, Inc, Foster City, California, Estados Unidos).

### **4.5. ESTUDIO ESTADÍSTICO**

---

El análisis estadístico de los datos fue realizado por el “Departamento de Ayuda a la Investigación, Área de Informática y Comunicaciones”, de la Universidad Complutense de Madrid, mediante el programa SAS, versión 9.4 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA) y el programa SPSS Statistics, versión 22 (Armonk, NY, USA) para los árboles de decisión.

De esta manera, una vez realizada la toma de muestras y realizados los cuestionarios, se realizó una estadística descriptiva de la población de estudio para posteriormente buscar la presencia de posibles asociaciones estadísticas entre la positividad a los agentes estudiados (*A. phagocytophilum*, *A. marginale*, *A. centrale*, *B. bigemina*, *B. divergens* y *T. annulata*) y todas las variables recogidas.

Los métodos estadísticos utilizados fueron los siguientes:

- Estadística descriptiva de las variables cualitativas, con la obtención de frecuencias y porcentajes de las categorías y de las variables cuantitativas, con la muestra útil, media, desviación estándar, intervalo

de confianza (IC) para la media al 95%, valor mínimo, cuartil inferior o percentil 25%, mediana o percentil 50%, cuartil superior o percentil 75% y valor máximo.

- Contraste con variable dependiente cualitativa: para medir la independencia o dependencia entre las dos variables categóricas, se empleó el test de la Chi cuadrado de Pearson ( $\chi^2$ ) y/o cuando fue necesario por tamaño muestral, el test exacto de Fischer. En las tablas dos por dos, además del Chi cuadrado de Pearson, se calculó el *odds ratio* (OR) para cuantificar el riesgo relativo de una variable.
- Contraste con variable dependiente cuantitativa: se llevó a cabo mediante la prueba t de Student para contrastar la hipótesis de igualdad entre las medias de dos grupos.
- Pruebas no paramétricas, empleadas para el análisis de las variables ordinales a nivel de granja. Se determinó si las medianas fueron iguales mediante el test de la suma de rangos de Wilcoxon, cuando se comparan dos grupos, o el test de Kruskal-Wallis, cuando se comparan más de dos grupos independientes. Además, mediante el coeficiente de correlación de Spearman se analizaron las asociaciones entre las diferentes variables cuantitativas y la prevalencia para cada agente a nivel de granja.
- Árbol de decisión (o CHAID, de sus siglas en inglés *Chi-square automatic interaction detection*): se completó el análisis con un estudio multivariante como alternativa para relacionar el efecto de varias variables causales con la variable dependiente.

En todas las pruebas realizadas, las diferencias se consideraron significativas para un valor de  $p < 0,05$ .



## 5. RESULTADOS





---

## 5.1. DESCRIPCIÓN DE LOS ANIMALES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO

---

Tal y como se ha descrito en el apartado de materiales y métodos de la presente tesis doctoral, en la selección de la muestra de estudio se tuvo en cuenta la población total de bovinos mantenidos en extensivo en la Comunidad de Madrid. En todos los casos se tomaron muestras sanguíneas y se recogieron los datos de los animales y sus explotaciones a través de las encuestas previamente descritas, si bien en algunas ocasiones no fue posible completar toda la información que le fue solicitada al ganadero o veterinario, lo que justifica que el tamaño de la muestra pueda ser diferente en función de las variables estudiadas.

En este subapartado de los resultados se describe estadísticamente la muestra estudiada para, a continuación, pasar a describir la evaluación de las posibles relaciones entre las variables analizadas.

### 5.1.1. DELIMITACIÓN DE LAS ZONAS DE ESTUDIO

Como resultado de la superposición de mapas se obtuvo un mapa de trabajo simplificado con el que se pudo determinar en qué zonas de estudio se encontraban los municipios de la Comunidad de Madrid (**Imagen 9**).

Tal y como se muestra en la imagen, los 179 municipios de la Comunidad de Madrid quedan distribuidos en las tres zonas climáticas definidas para esta región del centro de España (M: clima de montaña, F: clima mediterráneo continentalizado con veranos frescos, C: clima mediterráneo continentalizado con veranos cálidos). En la **Tabla 11** se muestran los municipios que disponen de granjas de bovino en extensivo, definiendo a qué zona climática corresponden. Se ha resaltado en negrita aquellos municipios de los que procedían las granjas que finalmente fueron muestreadas en este estudio.

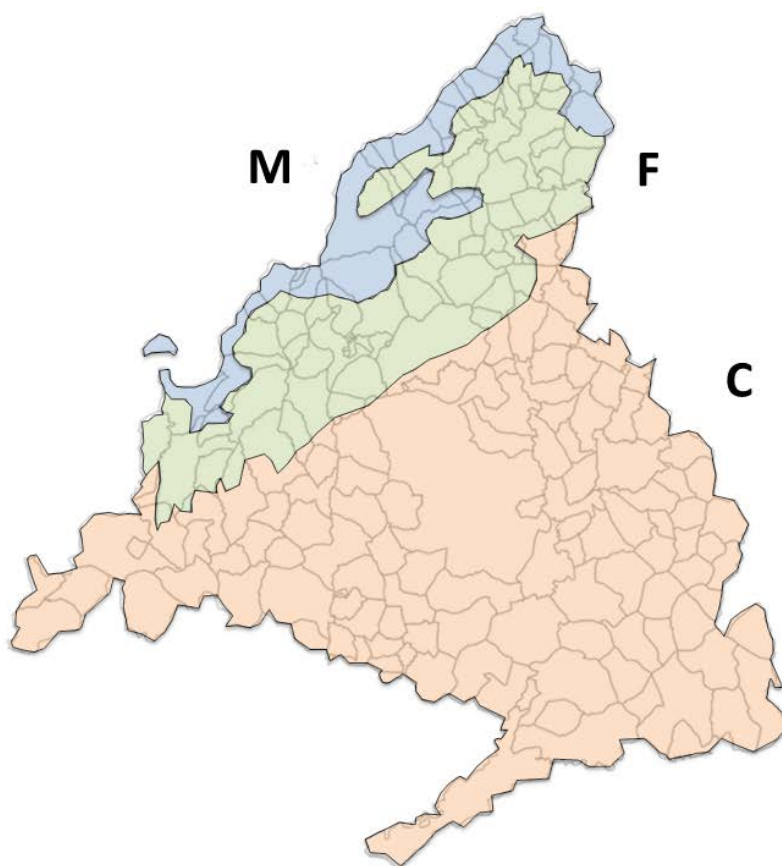


Imagen 9. Mapa empleado en el estudio, en el que se muestran los municipios incluidos en cada zona climática de la Comunidad de Madrid

Zonas Climáticas	Municipios
Montaña (M)	Alameda del Valle Braojos <b>Bustarviejo</b> Canencia <b>Cercedilla</b> Horcajuelo de la Sierra La Acebeda La Hiruela <b>Los Molinos</b> Lozoya Montejo de la Sierra Navacerrada Navarredonda y San Mamés Pinilla del Valle

	<b>Prádena del Rincón</b> Puebla de la Sierra Rascafría Robregordo San Lorenzo de El Escorial <b>Somosierra</b> Villavieja del Lozoya
Fresco (F)	Alpedrete <b>Becerril de la Sierra</b> Buitrago del Lozoya <b>Cabanillas de la Sierra</b> Collado Mediano <b>Collado Villalba</b> <b>Colmenar Viejo</b> Colmenarejo El Berrueco El Boalo ( <b>El Boalo-Cerceda-Mataelpino</b> ) El Escorial El Vellón <b>Fresnedillas de la Oliva</b> Galapagar Garganta de los Montes Gargantilla del Lozoya y Pinilla de Buitrago <b>Gascones</b> Guadalix de la Sierra <b>Guadarrama</b> Horcajo de la Sierra-Aoslos Hoyo de Manzanares La Cabrera La Serna del Monte Lozoyuela-Navas-Sieteiglesias Madarcos <b>Manzanares El Real</b> Miraflores de la Sierra <b>Moralzarzal</b> Navalafuente Patones <b>Pedrezuela</b>

	Piñuécar-Gandullas Puentes Viejas <b>Robledo de Chavela</b> Santa María de la Alameda <b>Soto del Real</b> Valdemanco Valdemorillo Venturada Zarzalejo
Cálido (C)	Arroyomolinos Cadalso de los Vidrios Cenicientos Chapinería Chinchón Ciempozuelos Cobeña Colmenar de Oreja Colmenar del Arroyo El Molar <b>Getafe</b> Majadahonda <b>Navalagamella</b> Pezuela de las Torres Ribatejada <b>Rivas-Vaciamadrid</b> Rozas de Puerto Real San Agustín del Guadalix San Martín de la Vega San Martín de Valdeiglesias Talamanca de Jarama Torrejón de Velasco <b>Tres Cantos</b> Valdetorres de Jarama Villa del Prado <b>Villamantilla</b>

Tabla 11. Municipios con ganado bovino en extensivo incluidos en cada una de las zonas climáticas de la Comunidad de Madrid. Los municipios a los que pertenecían las granjas muestreadas se resaltan en negrita.

### **5.1.2. RESULTADOS DE LA SELECCIÓN DE LA MUESTRA A INCLUIR EN EL ESTUDIO**

En base a la información recopilada sobre la distribución de la población de ganado vacuno en extensivo de la Comunidad de Madrid y con el apoyo del “Departamento de Ayuda a la Investigación, Área de Informática y Comunicaciones” de la Universidad Complutense de Madrid, como se comentó en materiales y métodos, se establecieron unos objetivos de tamaño de la muestra para llevar a cabo la recogida en cada una de las zonas climáticas en que se divide la Comunidad de Madrid en este estudio. Los resultados de la selección de la población de estudio se reflejan en la **Tabla 12**. El tamaño muestral final fue de 496 bóvidos, distribuidos en 34 granjas.

<b>Zona</b>	<b>Número de granjas (porcentaje)</b>	<b>Número de animales (porcentaje)</b>
<b>M</b>	8 (23,52%)	89 (17,94%)
<b>F</b>	21 (61,76%)	293 (59,07%)
<b>C</b>	5 (14,71%)	114 (22,98%)
<b>Total</b>	34 (100%)	496 (100%)

Tabla 12. Resultados de la selección de la población de estudio en función de la zona

La **Tabla 13** refleja el número de animales muestreados en cada una de las granjas estudiadas, indicando asimismo el tamaño de cada explotación y el porcentaje que representan sobre el tamaño muestral total del estudio.

<b>Zona</b>	<b>Granja (número de identificación)</b>	<b>Animales</b>		
		<b>Censo aproximado (N)</b>	<b>Nº de animales muestreados (n)</b>	<b>Porcentaje sobre el tamaño muestral total del estudio (%)</b>
<b>M</b>	1	24	6	1,21
	4	12	3	0,6
	20	84	21	4,23
	22	28	7	1,41
	24	24	6	1,21
	25	40	10	2,02
	27	44	11	2,22
	28	100	25	5,04
<b>F</b>	2	80	20	4,03
	3	12	3	0,6
	5	80	20	4,03
	6	20	5	1,01
	7	8	2	0,4
	8	40	10	2,02

	11	20	5	1,01
	12	24	6	1,21
	13	80	20	4,03
	14	124	31	6,25
	17	60	15	3,02
	19	56	14	2,82
	21	16	4	0,81
	23	24	6	1,21
	29	120	30	6,05
	30	100	25	5,04
	31	36	9	1,81
	32	48	12	2,42
	33	100	25	5,04
	34	68	17	3,43
	35	56	14	2,82
C	9	56	14	2,82
	10	40	10	2,02
	15	60	15	3,02
	18	200	50	10,08
	26	100	25	5,04

Tabla 13. Distribución de los animales en función de la granja

### **5.1.3. CARACTERIZACIÓN DE LOS ANIMALES Y SUS GRANJAS DE PROCEDENCIA**

A continuación se describe la distribución de la población de estudio en función de los datos de la reseña y se ofrecen otros datos de interés que fueron recogidos gracias a las encuestas descritas previamente. Algunos de estos datos son comunes para todos los animales pertenecientes a la misma explotación, por lo que para dichos resultados se ofrece de manera conjunta el dato de individuo y el de granja para facilitar su comprensión.

#### **5.1.3.1. Descripción de los datos de la reseña de los animales del estudio**

Entre los 496 animales que fueron incluidos en esta tesis doctoral había variedad de razas y edades. Asimismo, si bien la mayoría eran hembras, también fue posible incluir machos en el estudio.

##### ○ Raza

En la **Tabla 14** y el **Gráfico 1** puede observarse la distribución por raza de los individuos, destacando que el 38,18% (189/495) de los animales eran cruzados,

perteneciendo al grupo de “conjunto mestizo”. Las razas avileña-negra ibérica y frisona constituyen los siguientes grupos de raza más frecuentes en nuestra muestra, con un 15,35% (76/495), en ambos casos. Se han agrupado las razas con menos de 20 animales creando el grupo de “otras razas”, lo que supone un 5,05% (25/495), incluyendo las siguientes razas: asturiana de la montaña (0,4%, 2/495), asturiana de los valles (1,82%, 9/495), berrenda colorada (0,4%, 2/495), bruna de los pirineos (0,2%, 1/495), fleckvieh (0,4%, 2/495), parda (1,01%, 5/495) y parda de la montaña (0,81%, 4/495).

Raza	Frecuencia	Porcentaje
Avileña-negra ibérica	76	15,35
Charolés	20	4,04
Frisona	76	15,35
Lidia	26	5,25
Limusín	22	4,44
Conjunto mestizo	189	38,18
Rubia de Aquitania	37	7,47
Rubia gallega	24	4,85
Otras razas	25	5,05
<b>Total</b>	<b>495</b>	<b>100</b>

Tabla 14. Distribución de la población en función de la raza

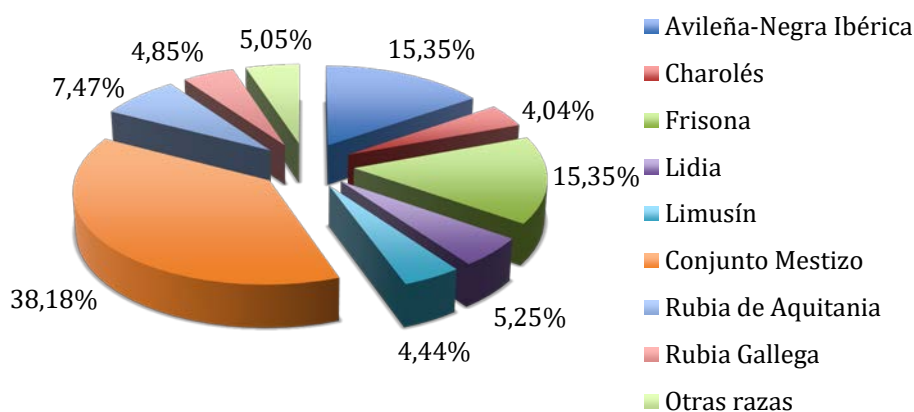


Gráfico 1. Descripción de la población en función de la raza

En la **tabla 15**, se refleja la raza que se encuentra de forma mayoritaria en cada una de las granjas.

Nº de Granja	Raza Mayoritaria
1	Limusín



2	Avileña-negra ibérica
3	Avileña-negra ibérica
4	Limusín
5	Conjunto mestizo
6	Conjunto mestizo
7	Lidia
8	Lidia
9	Lidia
10	Conjunto mestizo
11	Conjunto mestizo
12	Asturiana de los valles
13	Avileña-negra ibérica
14	Rubia de Aquitania
15	Conjunto mestizo
17	Frisona
18	Frisona
19	Frisona
20	Avileña-negra ibérica
21	Asturiana de los valles y de la montaña
22	Conjunto mestizo
23	Conjunto mestizo
24	Rubia de Aquitania
25	Conjunto mestizo
26	Conjunto mestizo
27	Conjunto mestizo
28	Conjunto mestizo
29	Conjunto mestizo y charolés
30	Conjunto mestizo
31	Conjunto mestizo y limusín
32	Avileña-negra ibérica
33	Rubia gallega
34	Conjunto mestizo
35	Avileña-negra ibérica

Tabla 15. Distribución de la raza principal en función de la granja

El estudio estadístico de los datos muestra que existen relaciones estadísticamente significativas entre las variables raza y zona (**Tabla 16**), con una  $p < 0,0001$ . Las razas de bovino no se distribuyen homogéneamente en la Comunidad de Madrid y, por tanto, la raza de los animales incluidos en este estudio es una variable dependiente, que varía en función de la zona en la que se incluye su granja de procedencia. En este sentido, en la zona C no se muestrearon animales de las razas avileña-negra ibérica, rubia de Aquitania, charolés y rubia gallega, encontrándose estas dos últimas razas únicamente en la zona F. En la zona M no se incluyen animales de razas charolés, rubia gallega, frisona y lidia.

		Zona			Total
		M	F	C	
Raza	Avileña-negra ibérica	19	57	0	76
	Charolés	0	20	0	20
	Frisona	0	29	47	76
	Lidia	0	11	15	26
	Limusín	8	12	2	22
	Conjunto mestizo	47	94	48	189
	Rubia de Aquitania	6	31	0	37
	Rubia gallega	0	24	0	24
	Otras razas	9	14	2	25
Total		89	292	114	495

Tabla 16. Distribución de la población según la raza y la zona

○ Sexo

En referencia al sexo de los animales, el 94,35% de los bóvidos fueron hembras (**Tabla 17**), pudiendo incluir únicamente en este estudio un total de 28 machos.

Sexo	Frecuencia	Porcentaje
Hembra	468	94,35
Macho	28	5,65
<b>Total</b>	496	100

Tabla 17. Distribución de la población según el sexo de los animales

Al igual que lo descrito para la raza, el sexo de los animales se relaciona estadísticamente ( $p = 0,0337$ ) con la zona de procedencia (**Tabla 18**). Encontramos que la mayor parte de los machos (82,1%, 23/28) se muestrearon en la zona F de estudio, mientras que la menor proporción se encuentra en la zona C (7,1%, 2/28).

		Sexo		Total
		Hembra	Macho	
Zona	M	86	3	89
	F	270	23	293
	C	112	2	114
	Total	468	28	496

Tabla 18. Distribución de la población según la zona y el sexo

○ Edad

La media de edad de los bovinos del estudio fue de  $5,53 \pm 3,9$  años, con un valor mínimo de 4 meses y máximo de 18 años. Se clasificó a los animales en cuatro grupos de edad (**Tabla 19**). Los animales menores de un año se clasificaron en el grupo de “terneros”, los animales entre uno y tres años en el grupo de “jóvenes”, los animales mayores de tres años y hasta ocho se incluyeron en el grupo de “adultos” y los animales con más de ocho años en el grupo de “geriátricos” (**Gráfico 2**). Tal y como puede observarse en la **Tabla 19** y en el **Gráfico 2**, los animales clasificados como adultos constituyen el grupo más prevalente (47,06%).

Grupos de Edad	Frecuencia	Porcentaje
Terneros (<1 año)	15	3,04
Jóvenes (1-3 años)	135	27,38
Adultos (>3-8 años)	232	47,06
Geriátricos (>8 años)	111	22,52
<b>Total</b>	493	100

Tabla 19. Distribución de la población según la edad

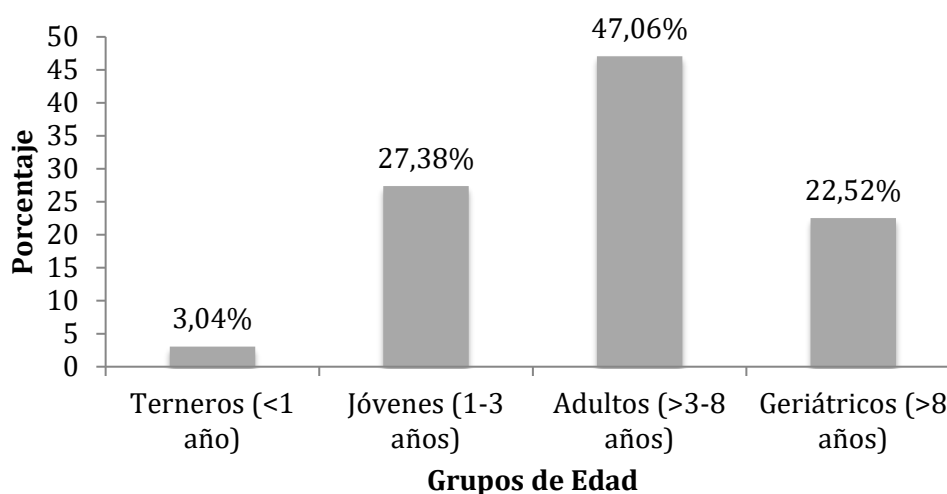


Gráfico 2. Porcentaje de animales distribuidos según el grupo de edad

Se encontró asociación estadística entre las variables edad y raza (**Tabla 20**), con una  $p < 0,0001$ . En todos los grupos de edad, la raza más frecuente fue conjunto mestizo. No se recogieron muestras de animales menores de un año, grupo de “terneros”, de las razas charolés, frisona, rubia gallega y otras razas.

		Edad				Total
		Ternero	Joven	Adulto	Geriátrico	
Raza	Avileña-negra ibérica	3	8	37	27	75
	Charolés	0	13	5	2	20
	Frisona	0	24	50	2	76
	Lidia	2	9	10	5	26
	Limusín	1	7	13	1	22
	Conjunto mestizo	7	47	86	48	188
	Rubia de Aquitania	2	16	11	8	37
	Rubia gallega	0	1	12	11	24
	Otras razas	0	10	8	7	25
	Total	15	135	232	111	493

Tabla 20. Distribución de la población según la raza y la edad

Se encontró asociación estadística entre las variables edad y zona (**Tabla 21**), con una  $p = 0,0289$ . El mayor número de bovinos de cada grupo de edad se localizaban en la zona F. Concretamente, en el caso de los grupos de “terneros” y “adultos”, los que se localizaban en la zona F representan el 60% y el 60,4% del total dentro de cada grupo de edad, respectivamente, el 59,2% en el grupo de “jóvenes” y el 55,8% en el grupo de animales mayores de ocho años. No obstante, al considerar el número total de animales procedentes de cada una de las zonas del estudio se observa que en la zona M se encontraba el mayor porcentaje de terneros, bovinos jóvenes y geriátricos, mientras que en la zona C destaca un mayor porcentaje de animales adultos (**Gráfico 3**).

		Edad				Total
		Terneros	Jóvenes	Adultos	Geriátricos	
Zona	M	4	27	28	29	88
	F	9	80	140	62	291
	C	2	28	64	20	114
	Total	15	135	232	111	493

Tabla 21. Distribución de la población según la zona y la edad

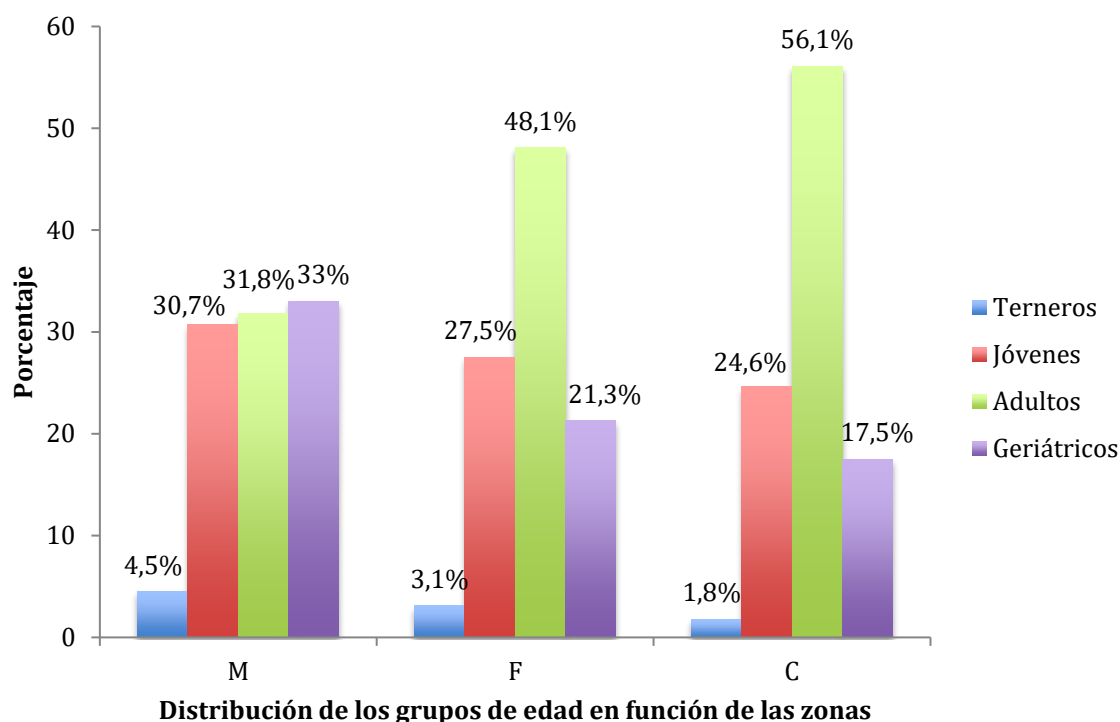


Gráfico 3. Porcentaje de bovinos de los diferentes grupos de edad en función de las zonas de estudio

#### 5.1.3.2. Distribución geográfica

En la **tabla 22** se detalla el municipio y la zona concretos donde se encontraban las granjas y animales del estudio con su medida de altitud. La altitud media a la que se encontraban las explotaciones fue de  $936 \pm 218,81$  m. Además, se ha incluido el número de animales para ayudar en la comprensión de los resultados.

En el caso concreto de las granjas pertenecientes al municipio de Robledo de Chavela, la granja nº 1 se localizó a una altitud de 1.228 m, por lo que se clasificó en la zona de montaña (M), mientras que las granjas nº 34 y 35 se encontraron a una altitud de 954 y 918 m de altitud, respectivamente, incluyéndose en la zona de clima continental con veranos frescos (F).

Zona	Municipio	Nº de Granja	Altitud (m)	Número de animales (%)
M	Bustarviejo	20	1.222	21 (4,23%)
		4	1.214	3 (0,6%)
	Cercedilla	27	1.316	11 (2,22%)
		24	1.176	6 (1,21%)
	Los Molinos	25	1.261	10 (2,02%)

	Prádena del Rincón	28	1.200	25 (5,04%)
	Robledo de Chavela	1	1.228	6 (1,21%)
	Somosierra	22	1.400	7 (1,41%)
<b>F</b>	Becerril de la Sierra	6	1.061	5 (1,01%)
		12	883	6 (1,21%)
	Cabanillas de la Sierra	29	912	30 (6,05%)
	Colmenar Viejo	30	983	25 (5,04%)
	El Boalo	11	980	5 (1,01%)
		19	980	14 (2,82%)
	Fresnedillas de la Oliva	21	925	4 (0,81%)
	Gascones	13	1.054	20 (4,03%)
		33	1.111	25 (5,04%)
	Guadarrama	8	928	10 (2,02%)
	Manzanares El Real	2	1.026	20 (4,03%)
	Mataelpino	3	1.120	3 (0,6%)
	Moralzarzal	7	973	2 (0,4%)
	Pedrezuela	5	860	20 (4,03%)
	Robledo de Chavela	34	954	17 (3,43%)
		35	918	14 (2,82%)
	Soto del Real	14	910	31 (6,25%)
		31	1.000	9 (1,81%)
		32	1.074	12 (2,42%)
	Collado Villalba	17	917	15 (3,02%)
		23	900	6 (1,21%)
<b>C</b>	Getafe	15	563	15 (3,02%)
	Navalagamella	26	753	25 (5,04%)
	Rivas-Vaciamadrid	18	543	50 (10,08%)
	Tres Cantos	10	694	10 (2,02%)
	Villamantilla	9	575	14 (2,82%)

Tabla 22. Distribución geográfica de las granjas y los animales en función del municipio y las zonas

Asimismo, la **Imagen 10** muestra la distribución geográfica de los municipios y las zonas donde se encontraban ubicadas las granjas y animales del estudio.

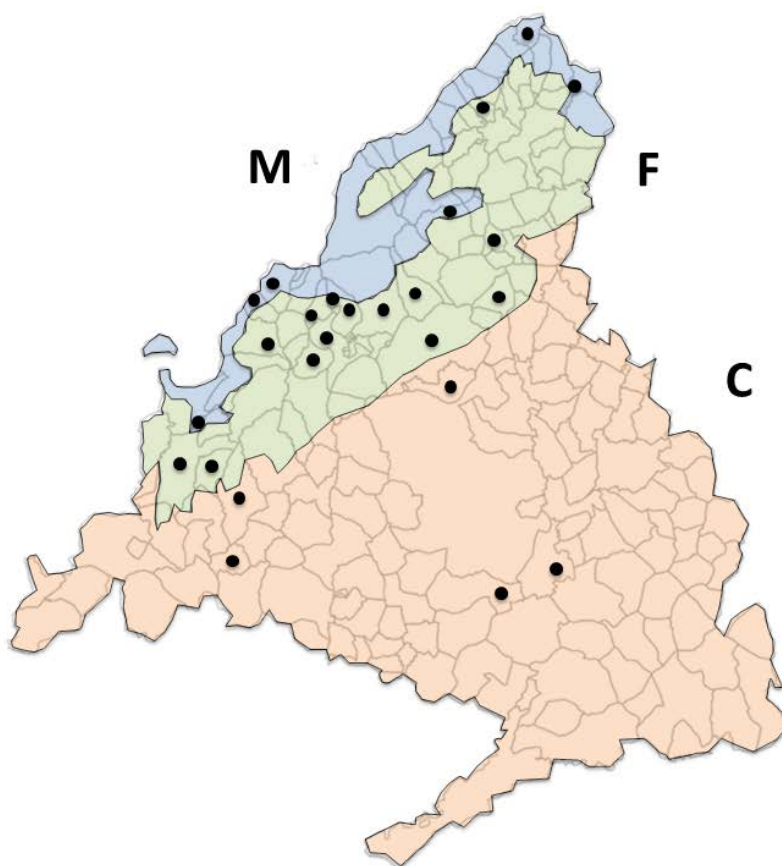


Imagen 10. Mapa de la Comunidad de Madrid con los municipios y las zonas donde se encontraban las granjas y animales del estudio

#### 5.1.3.3. Momento de la recogida de las muestras

La recogida de las muestras se realizó entre los meses de abril a octubre de 2015, y se hizo en todos los casos, por la mañana, entre las 8:30 y 13h. Entre los registros se apuntó la fecha de recogida y se midió la temperatura y la humedad relativa en el momento de la toma de muestras.

En el **Gráfico 4** se muestra el porcentaje de granjas y animales muestreados en función de la estación del año. En la **Tabla 23** se observan los registros del mes y estación del año de la recogida de muestras en cada granja, así como los valores de temperatura y humedad relativa.

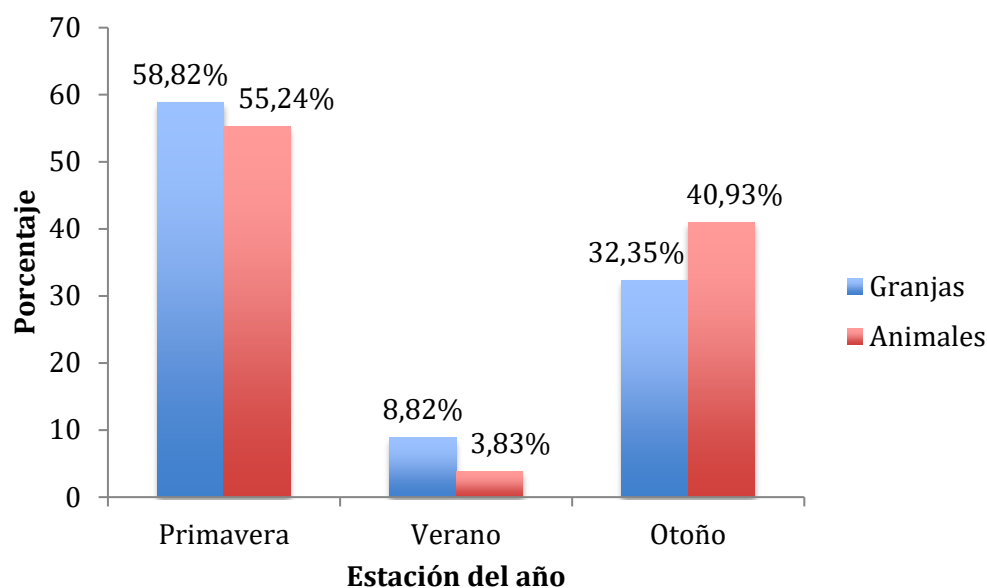


Gráfico 4. Estación del año de recogida de las muestras

Zona	Nº de Granja	Mes	Estación del Año	Temperatura (°C)	Humedad relativa (%)
M	1	Abril	Primavera	15	59
	4	Abril	Primavera	8	80
	20	Junio	Primavera	21	45
	22	Agosto	Verano	23	31
	24	Septiembre	Verano	8	65
	25	Septiembre	Otoño	20	28
	27	Septiembre	Otoño	18	49
	28	Octubre	Otoño	15	76
F	2	Abril	Primavera	11	70
	3	Abril	Primavera	11	70
	5	Abril	Primavera	18	66
	6	Mayo	Primavera	13	66
	7	Mayo	Primavera	13	66
	8	Mayo	Primavera	15	66
	11	Mayo	Primavera	23	40
	12	Mayo	Primavera	13	41
	13	Mayo	Primavera	16	48
	14	Mayo	Primavera	17	47
	17	Mayo	Primavera	20	44
	19	Junio	Primavera	22	48
	21	Junio	Primavera	14	84
	23	Septiembre	Verano	15	50
	29	Octubre	Otoño	9	72
	30	Octubre	Otoño	14	74
	31	Octubre	Otoño	11	52



	32	Octubre	Otoño	15	41
	33	Octubre	Otoño	10	56
	34	Octubre	Otoño	11	68
	35	Octubre	Otoño	16	64
<b>C</b>	9	Mayo	Primavera	14,5	34
	10	Mayo	Primavera	23	39
	15	Mayo	Primavera	16	48
	18	Mayo	Primavera	21	33
	26	Septiembre	Otoño	19	46

Tabla 23. Mes, estación del año, temperatura y humedad relativa de recogida de las granjas en el momento del muestreo

La temperatura media fue de  $16 \pm 4,19^{\circ}\text{C}$  y la humedad relativa media registrada fue de  $53,5 \pm 14,79\%$ .

#### 5.1.3.4. Características del sistema productivo de las granjas estudiadas

La densidad media de animales por hectárea en las granjas incluidas en el estudio fue de  $0,83 \pm 0,58$  animales/ha, siendo el mínimo de 0,1 y el máximo de 2,5 animales/ha, tal y como puede observarse en la **Tabla 24**. Por otra parte, los datos registrados en las encuestas relacionados con el contacto con otros bóvidos a través de la introducción de animales en el rebaño procedentes de otras ganaderías en los últimos 5 años para la reposición o por el uso de pastos comunales, se han reflejado igualmente en la **Tabla 24**.

Nº de Granja	Densidad (animales/ha)	Introducción de animales de otras ganaderías	Uso de pastos comunales
<b>1</b>	-	No	No
<b>2</b>	0,53	Sí	No
<b>3</b>	-	Sí	No
<b>4</b>	-	-	-
<b>5</b>	-	Sí	Sí
<b>6</b>	0,1	Sí	Sí
<b>7</b>	-	Sí	No
<b>8</b>	1	Sí	No
<b>9</b>	0,95	Sí	No
<b>10</b>	0,25	Sí	No
<b>11</b>	0,4	Sí	No
<b>12</b>	0,87	Sí	No
<b>13</b>	0,14	No	Sí

14	1,18	Sí	No
15	2,5	No	No
17	-	No	No
18	1,18	No	No
19	2	No	No
20	-	-	-
21	-	-	-
22	0,22	Sí	Sí
23	1,15	Sí	Sí
24	0,21	Sí	Sí
25	0,5	Sí	Sí
26	0,24	Sí	No
27	0,6	Sí	Sí
28	0,14	Sí	Sí
29	0,62	Sí	Sí
30	1,25	Sí	No
31	2	No	No
32	0,39	Sí	No
33	0,55	No	No
34	1,12	Sí	No
35	0,39	Sí	No

Tabla 24. Registros de densidad, uso de pastos comunales e introducción de animales procedentes de otras ganaderías en las granjas

Un 32,26% de las granjas (10/31) compartían pastos con animales de otras ganaderías, lo que supone que el 29,91% de los animales (140/468) se encontraban en esta situación. En referencia a la introducción de animales procedentes de otras explotaciones de la Comunidad de Madrid o de otras Comunidades Autónomas de España en los últimos 5 años, el 74,19% de las explotaciones (23/31) habían introducido nuevos animales procedentes de otras explotaciones, lo que supone que el 67,09% de los bovinos (314/468) pudieron relacionarse con estos animales no nacidos en la granja.

#### 5.1.3.5. Presencia de garrapatas en el momento de la toma de muestras y tratamientos antiparasitarios

En el momento de la toma de muestras, en 12 de las 34 granjas muestreadas se observaron garrapatas en los animales (35,29%). No obstante, debe tenerse en cuenta que los ganaderos o responsables de los animales describieron en las encuestas realizadas la presencia de garrapatas en todas las explotaciones incluidas en el estudio.

Fue posible obtener datos sobre la desparasitación empleada en un total de 33 de las 34 granjas incluidas en el estudio y únicamente en dos de ellas no se empleaba

ningún tratamiento para desparasitar a los animales, lo que supone que el 87,83% de los animales incluidos en esta tesis doctoral de los que se pudo obtener este dato (433/493) eran desparasitados. En este sentido, a modo de resumen, la **Tabla 25** y el **Gráfico 5** reflejan el número de granjas en las que se realizaban ninguna, una, dos o más de dos desparasitaciones al año. Asimismo, se ha incluido el dato del número de animales en cada caso, por considerar interesante contar con esta información de cara a la interpretación posterior de los resultados.

Número de desparasitaciones al año	Número de granjas (porcentaje)	Número de animales (porcentaje)
<b>Ninguna</b>	2 (6,06%)	60 (12,17%)
<b>Una vez al año</b>	11 (33,33%)	135 (27,38%)
<b>Dos veces al año</b>	18 (54,55%)	262 (53,14%)
<b>Más de dos veces al año</b>	2 (6,06%)	36 (7,3%)
<b>Total</b>	33 (100%)	493 (100%)

Tabla 25. Número de desparasitaciones al año en la población estudiada

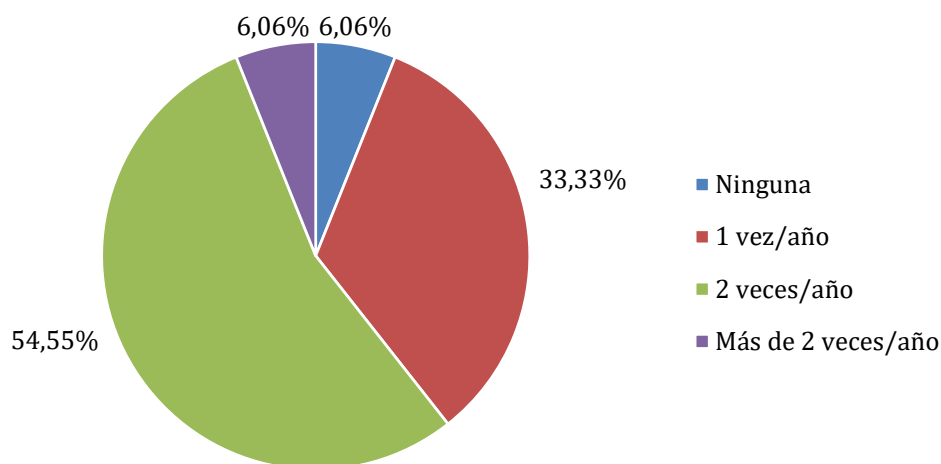


Gráfico 5. Porcentaje de granjas en las que se desparasitaba una vez al año, dos veces al año, más de dos veces al año, así como en las granjas donde no se desparasitaba

Como observamos en el **Gráfico 6**, en la zona de clima fresco (F) y en la zona de montaña (M) predominaron el uso de los tratamientos aplicados dos veces al año, mientras que en la zona de clima cálido (C) se desparasita más frecuentemente una vez al año.

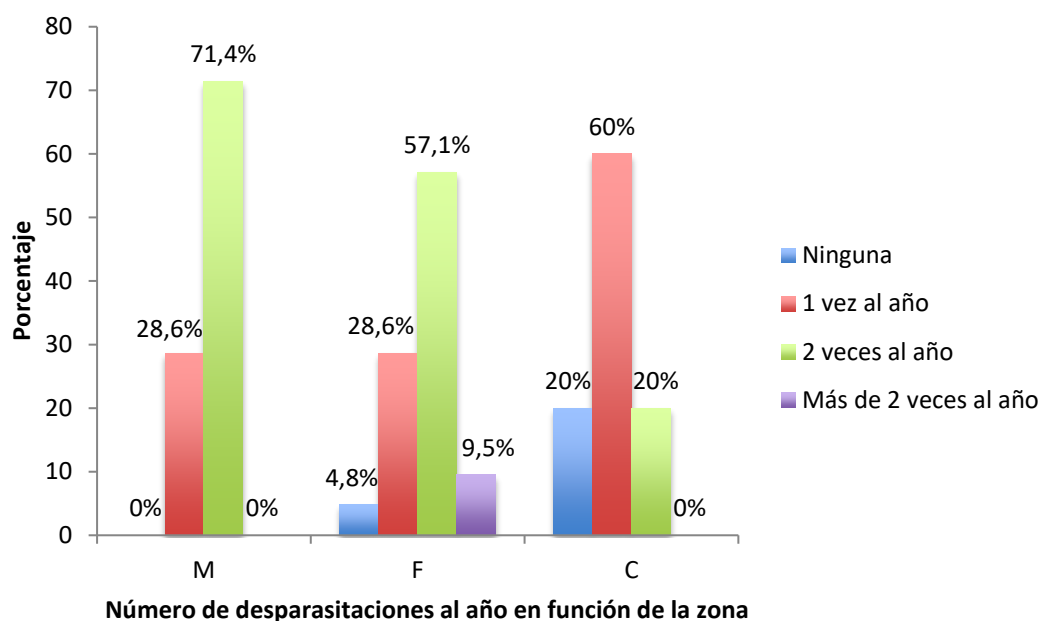


Gráfico 6. Distribución de las granjas según la zona donde se encuentran y el número de veces que desparasita por año

Por otra parte, y de forma relacionada, el número de desparasitaciones al año varía en función de la raza del animal ( $p < 0,0001$ ), tal y como puede observarse en la **Tabla 26**. Concretamente, el 61,84% de las vacas de raza frisona y el 38,74% de las de raza de lidia incluidas en este estudio no eran sometidas a tratamientos antiparasitarios, mientras que el 65% de los animales de raza charolés y el 8,5% de raza conjunto mestizo se desparasitaban más de dos veces al año.

		Desparasitaciones por año				Total
		Ninguna	1 vez al año	2 veces al año	Más de 2 veces al año	
Raza	Avileña-negra ibérica	0	20	56	0	76
	Charolés	0	2	5	13	20
	Frisona	47	15	14	0	76
	Lidia	10	14	2	0	26
	Limusín	0	8	11	0	19
	Conjunto mestizo	1	74	98	16	189
	Rubia de Aquitania	0	0	37	0	37
	Rubia gallega	0	0	24	0	24
	Otras razas	2	2	15	6	25
	<b>Total</b>	60	135	262	35	492

Tabla 26. Distribución de la población según la raza y el número de desparasitaciones al año

Los productos utilizados más frecuentemente fueron las lactonas macrocíclicas (en 17 granjas, con el 48,29% de los animales), seguido por la combinación de piretroides junto con lactonas macrocíclicas (en ocho granjas, con el 24,15% de los animales) y el uso únicamente de piretroides (en cuatro granjas, con el 8,12% de los animales). Solo en una granja se usaba la combinación de piretroides, lactonas macrocíclicas y organofosforados (6,62% de los animales) (**Tabla 27**).

Número de desparasitaciones al año	Número de granjas (porcentaje)	Número de animales (porcentaje)
Ninguna	2 (6,06%)	60 (12,17%)
Una vez al año	11 (33,33%)	135 (27,38%)
Dos veces al año	18 (54,55%)	262 (53,14%)
Más de dos veces al año	2 (6,06%)	36 (7,3%)
<b>Total</b>	<b>33 (100%)</b>	<b>493 (100%)</b>

Tabla 27. Tratamientos antiparasitarios utilizados en la población estudiada

La **Tabla 28** muestra la relación entre el fármaco empleado como antiparasitario y el número de desparasitaciones por año. Nueve de las 32 granjas para las que se pudo conocer ambos datos desparasitaban con lactonas macrocíclicas dos veces al año, seguido de ocho granjas que desparasitaban con el mismo producto una vez al año. Cuatro de las granjas desparasitaban dos veces al año con piretroides y otras cuatro también aplicaban tratamiento antiparasitario dos veces al año, pero con la combinación de piretroides y lactonas macrocíclicas. Esta misma combinación era empleada por otras dos granjas en una única ocasión al año y por otras dos granjas más de dos veces al año.

		Desparasitaciones por año				Total
		Ninguna	1 vez al año	2 veces al año	Más de 2 veces al año	
Fármaco empleado	Ninguno	2	0	0	0	2
	Piretroides	0	0	4	0	4
	Lactonas macrocíclicas	0	8	9	0	17
	Piretroides y L. macrocíclicas	0	2	4	2	8
	Piretroides, L. macrocíclicas y Organofosforados	0	0	1	0	1
	<b>Total</b>	<b>2</b>	<b>10</b>	<b>18</b>	<b>2</b>	<b>32</b>

Tabla 28. Distribución de las granjas según el fármaco empleado como antiparasitario y el número de desparasitaciones por año

Tal y como se observa en el **gráfico 7**, en todas las zonas predomina el uso de las lactonas macrocíclicas, seguido en la zona de montaña (M) y de clima fresco (F) por el uso de la combinación de piretroides y lactonas macrocíclicas.

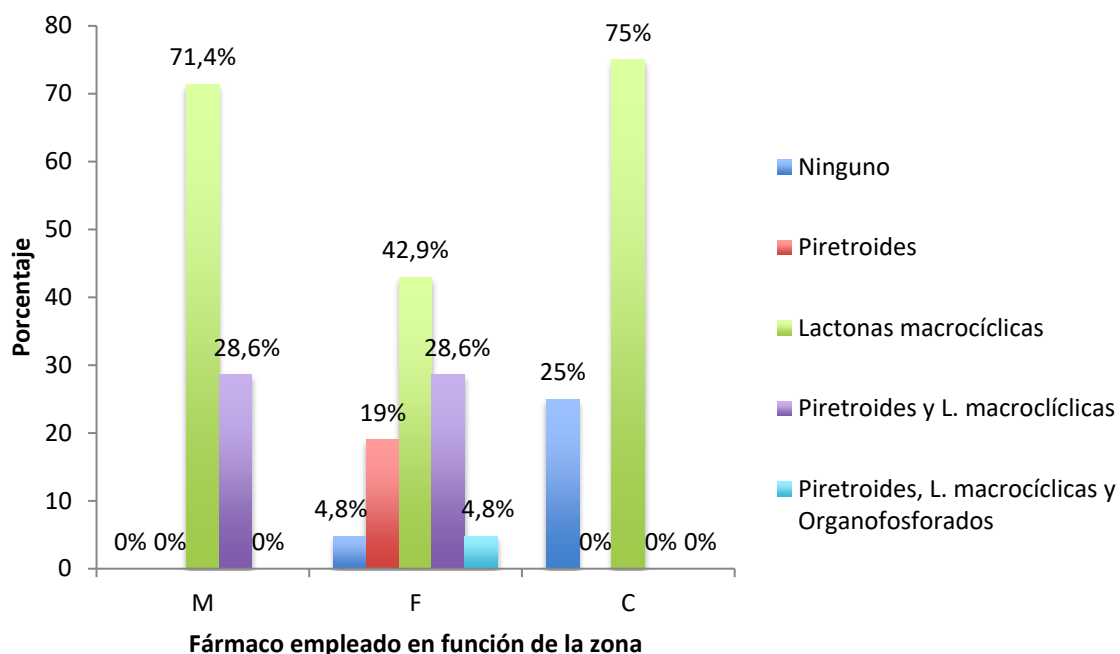


Gráfico 7. Distribución de las granjas según la zona donde se encuentran y el fármaco empleado para desparasitar

#### 5.1.3.6. Historial de enfermedades transmitidas por garrapatas

La **Tabla 29** muestra los datos relacionados con el historial de casos clínicos de enfermedades transmitidas por garrapatas en las granjas estudiadas.

Nº de Granja	Presentación de casos clínicos
1	No
2	No
3	No
4	-
5	Sí
6	Sí
7	No
8	No
9	No
10	Sí
11	No
12	No

13	No
14	Sí
15	No
17	Sí
18	No
19	Sí
20	-
21	-
22	No
23	No
24	No
25	No
26	No
27	No
28	No
29	Sí
30	No
31	Sí
32	No
33	No
34	No
35	No

Tabla 29. Registros de la presentación de casos clínicos en las granjas

En el 25,81% de las granjas (8/31) se habían presentado casos previos de animales con signos clínicos compatibles con infección con los agentes estudiados, por lo que el 28,63% (134/468) de los animales vivían en explotaciones donde había habido casos clínicos previos.

Debido a las condiciones de recogida de las muestras y por el tipo del sistema productivo, no fue posible obtener información individualizada en relación al historial clínico de cada animal incluido en el estudio. No obstante, en el momento de la toma de muestras, ninguno de los animales del estudio mostraba signos clínicos reseñables. Sin embargo, los veterinarios clínicos describieron casos de animales con signos clínicos que asociaban a enfermedades transmitidas por garrapatas, incluso en algunas ocasiones se habían diagnosticado como *Babesia* spp. o *Theileria* spp. mediante frotis sanguíneo.

Concretamente, algunos de los municipios en los que se tenía constancia de casos clínicos previos de descenso de la condición corporal y hematuria, a lo que se unía en ocasiones fiebre alta, linfadenomegalia y marcada palidez de mucosas, fueron

Santa María de la Alameda, cerca de Robledo de Chavela, El Boalo, Becerril de la Sierra, Collado Villalba y Moralarzaral.

### 5.1.3.7. Contacto con animales de otras especies

#### ○ Contacto con animales domésticos

En algunos casos, los animales convivían con otros animales domésticos. Concretamente, un 43,75% de las granjas estaban en contacto con otros animales domésticos (caballos y perros) (**Tabla 30**).

Presencia de Animales Domésticos	Número de granjas (porcentaje)	Número de animales (porcentaje)
<b>Sí</b>	14 (43,75%)	242 (51,38%)
<b>No</b>	18 (56,25%)	229 (48,62%)
<b>Total</b>	32 (100%)	471 (100%)

Tabla 30. Distribución de la población estudiada en función del contacto con animales domésticos

#### ○ Contacto con animales silvestres

En las explotaciones donde se encontraban los animales, los ganaderos describieron que el ganado tenía contacto con diferentes especies de fauna silvestre de la zona (**Tabla 31**). En concreto, un 82,35% de las granjas presentaron contacto con jabalíes (*Sus scrofa*), un 52,94% con carnívoros silvestres (incluyendo: lobo (*Canis lupus*), tejón común (*Meles meles*) y zorro (*Vulpes vulpes*)), un 88,24% con conejos (*Oryctolagus cuniculus*) y liebres (*Lepus granatensis*), un 61,76% con rumiantes silvestres (entre los que se describieron la cabra montesa (*Capra pyrenaica*), el corzo (*Capreolus capreolus*), el ciervo (*Cervus elaphus hispanicus*) y el gamo (*Dama dama*)) y un 47,06% con aves rapaces.

Presencia de:		Número de granjas (porcentaje)	Número de animales (porcentaje)
<b>Jabalíes</b>	Sí	28 (82,35%)	414 (83,47%)
	No	6 (17,65%)	82 (16,53%)
<b>Carnívoros silvestres</b>	Sí	18 (54,94%)	244 (49,19%)
	No	16 (47,06%)	252 (50,81%)
<b>Conejos y liebres</b>	Sí	30 (88,24%)	431 (86,9%)
	No	4 (11,76%)	65 (13,1%)
<b>Rumiantes silvestres</b>	Sí	21 (61,76%)	303 (61,09%)
	No	13 (38,24%)	193 (38,91%)



<b>Aves rapaces</b>	Sí	16 (47,06%)	246 (49,6%)
	No	18 (52,94%)	250 (50,4%)

Tabla 31. Distribución de la población estudiada en función del contacto con animales silvestres

## 5.2. RESULTADOS DE LA HEMATOLOGÍA Y BIOQUÍMICA SANGUÍNEA DE LOS ANIMALES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO

A partir de las muestras sanguíneas de los animales incluidos en el estudio, se realizó una analítica sanguínea básica que incluía el estudio hematológico y la determinación de la concentración de proteínas séricas y de las transaminasas hepáticas AST y ALT. Los valores analíticos medios, desviaciones típicas y valores mínimo y máximo obtenidos en cada caso se reflejan en la **Tabla 32**.

Valores Analíticos	N	Media	Desviación estándar	Mínimo	Máximo
Glóbulos rojos x $10^6/\mu\text{l}$	349	7,09	1,35	4,33	13,74
Hemoglobina (g/dl)	348	12,33	1,62	8,1	17,9
Hematocrito (%)	349	31,76	4,42	21,3	46,7
VCM (fl)	349	45,37	5,05	27,9	60,5
HCM (pg)	348	17,66	2,01	11,3	23,7
CHCM (g/dl)	348	38,92	1,02	35,8	43,5
Leucocitos x $10^3/\mu\text{l}$	351	9,12	2,69	2,99	20,18
Neutrófilos x $10^3/\mu\text{l}$	351	2,48	1,17	0,3	8,9
Linfocitos x $10^3/\mu\text{l}$	351	5,27	2,16	0,6	13,1
Monocitos x $10^3/\mu\text{l}$	351	0,41	0,23	0	1,8
Eosinófilos x $10^3/\mu\text{l}$	351	0,86	0,51	0,1	2,9
Basófilos x $10^3/\mu\text{l}$	351	0,07	0,06	0	0,5
Plaquetas x $10^3/\mu\text{l}$	349	249,4	133,3	28	1203
AST (U/l)	352	112,29	142,99	52	1805
ALT (U/l)	352	40,72	30,66	8	394
Proteínas Totales (g/dl)	352	7,51	0,74	5,7	10,4

Tabla 32. Valores medios, desviaciones estándar y valores mínimos y máximos de las variables analíticas (VCM, volumen corpuscular medio; HCM, hemoglobina corpuscular media; CHCM, concentración de hemoglobina corpuscular media; AST, aspartato aminotransferasa y ALT, alanina aminotransferasa)

Si bien en la mayoría de los animales los parámetros de la analítica sanguínea se encontraban dentro de los rangos de referencia para la especie, se detectaron en algunos casos alteraciones hematológicas o de la bioquímica que se han resumido en las **Tablas 33 a 35**.

En relación a la serie eritroide, tal y como puede observarse en la **Tabla 33**, un 2,3% y un 1,7% de los bóvidos mostraron un descenso del hematocrito y del recuento de glóbulos rojos, respectivamente, si bien el valor mínimo encontrado en cada caso fue de 21,3% de hematocrito y de 4,33 millones de eritrocitos por microlitro de sangre. En los animales con anemia, ésta se caracterizó por ser normocítica y con valores de HCM dentro de los rangos de referencia.

El 35,6% de los bovinos de este estudio tuvieron valores de HCM superiores a 18 pg, mientras que el 30,8% tuvieron valores de CHCM por encima del límite superior, fijado en 39 g/dl.

En cuanto a las plaquetas, el 9,7% de los animales mostraban trombocitopenia, con un valor mínimo de 28.000 plaquetas por microlitro de sangre en uno de los bovinos del estudio. Únicamente dos bóvidos mostraron un aumento del recuento de plaquetas en sangre periférica, con un valor máximo de 1,2 millones de plaquetas por microlitro.

Rango de valores de la serie roja y plaquetaria	GR	Hb	Htc	VCM	HCM	CHCM	Plaquetas
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<b>Bajo</b>	6 (1,7%)	0 (0%)	8 (2,3%)	40 (11,5%)	14 (4%)	0 (0%)	34 (9,7%)
<b>Normal</b>	334 (95,7%)	335 (96,3%)	340 (97,4%)	309 (88,5%)	210 (60,4%)	241 (69,2%)	313 (89,7%)
<b>Alto</b>	9 (2,6%)	13 (3,7%)	1 (0,28%)	0 (0%)	124 (35,6%)	107 (30,8%)	2 (0,6%)
<b>Total</b>	349 (100%)	348 (100%)	349 (100%)	349 (100%)	348 (100%)	348 (100%)	349 (100%)

Tabla 33. Distribución de la población de animales en función de los rangos de valores analíticos de la serie roja y plaquetaria (GR, recuento de glóbulos rojos; Hb, hemoglobina; Htc, hematocrito)

En relación a la serie leucocitaria, tal y como se observa en la **Tabla 34**, el 1,13% de los bovinos del estudio presentaban leucopenia por linfopenia, mientras que el 12% presentaba leucocitosis, en la mayoría de las ocasiones por linfocitosis (31/42), con un único caso debido a neutrofilia (1/42) y el resto causados por aumento de los recuentos de neutrófilos y linfocitos, pero permaneciendo ambas poblaciones dentro de los rangos de referencia para la especie.

Los recuentos absolutos de monocitos y eosinófilos estaban aumentados en el 3,7% y 1,4% de los casos.

Rango de valores de la serie blanca	Leucocitos	Neutrófilos	Linfocitos	Monocitos	Eosinófilos	Basófilos
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
<b>Bajo</b>	4 (1,1%)	5 (1,4%)	20 (5,7%)	1 (0,3%)	0 (0%)	0 (0%)
<b>Normal</b>	305 (86,9%)	344 (98%)	280 (79,7%)	337 (96%)	346 (98,6%)	348 (99,1%)
<b>Alto</b>	42 (12%)	2 (0,6%)	51 (14,5%)	13 (3,7%)	5 (1,4%)	3 (0,8%)
<b>Total</b>	351 (100%)	351 (100%)	351 (100%)	351 (100%)	351 (100%)	351 (100%)

Tabla 34. Distribución de la población de animales en función de los rangos de valores analíticos de la serie blanca

Finalmente, en relación a las alteraciones de la bioquímica sanguínea, el 35,8% de los animales del estudio presentaban valores de AST por encima del rango de referencia y el 2% en el caso de la ALT, fijado en 100 y 37 U/l, respectivamente. Se presentó hiperproteinemia en el 34,4% de la muestra del estudio, si bien en la mayoría de las ocasiones se trataba de ligeros aumentos, encontrándose la concentración proteica en valores en torno a 8 g/dl (**Tabla 35**).

Rangos de parámetros de la bioquímica	AST	ALT	PT
	n (%)	n (%)	n (%)
<b>Bajo</b>	0 (0%)	0 (0%)	2 (0,6%)
<b>Normal</b>	226 (64,2%)	345 (98%)	229 (65%)
<b>Alto</b>	126 (35,8%)	7 (2%)	121 (34,4%)
<b>Total</b>	352 (100%)	352 (100%)	352 (100%)

Tabla 35. Distribución de la población de animales en función de los rangos de los valores analíticos de los parámetros de la bioquímica

### 5.3. RELACIONES ENTRE LA AMPLIFICACIÓN DE ADN DE LOS AGENTES ESTUDIADOS Y LAS VARIABLES EPIDEMIOLÓGICAS RECOGIDAS

En los bóvidos de nuestro estudio hemos observado amplificación de ADN de *A. phagocytophilum*, *A. marginale*, *B. bigemina*, *B. divergens* y *T. annulata*. En el caso de *A. centrale*, no se amplificó ADN de este agente en ninguna muestra. En 227 de los 496 bovinos muestreados (45,76%) no se detectó ninguno de los agentes del estudio. Las granjas donde no se amplificó ningún agente fueron la nº 4, en Cercedilla, la nº 7, en Moralarzal, la nº 9, en Villamantilla, la nº 12, en Becerril de la Sierra, y la nº 18, en Rivas-Vaciamadrid.

#### **5.3.1. RESULTADOS DE LA PCR DE *Anaplasma phagocytophilum* EN LOS ANIMALES DE ESTUDIO**

##### **5.3.1.1. Prevalencia en la Comunidad de Madrid**

En las PCRs realizadas, hubo amplificación de ADN de *Anaplasma phagocytophilum* en dos granjas, lo que supone la presencia de este agente en el 5,88% de las explotaciones analizadas. Concretamente se detectó ADN de *A. phagocytophilum* en nueve animales, con lo que la prevalencia de este agente en bovinos en extensivo de esta región del centro peninsular es del  $1,81 \pm 1,18\%$  (con un intervalo de confianza al 95% de 0,6 a 3%). En cuatro de estos nueve animales únicamente se amplificó este agente.

##### **5.3.1.2. Relación entre la positividad a *A. phagocytophilum* y los datos epidemiológicos recogidos**

###### **○ Relación de la prevalencia con datos de la reseña de los animales**

La **raza** y el **sexo** no estaban asociados estadísticamente con la amplificación de *A. phagocytophilum* ( $p=0,07$  y  $p=1$ , respectivamente). Concretamente, los nueve animales eran todos hembras, pertenecientes a las razas conjunto mestizo (5/9), parda (2/9), parda de la montaña (1/9) y rubia de Aquitania (1/9).

La **edad** tampoco se asociaba estadísticamente con la positividad mediante PCR a *A. phagocytophilum*, ni como variable categórica ( $p=0,65$ ), ni como variable numérica

( $p=0,72$ ). Los bóvidos a partir de cuyas muestras sanguíneas se obtuvo amplificación de ADN de este agente tenían una edad media de  $6,21 \pm 5,78$  años, con 1,84 años el más joven y 16,38 años el animal de mayor edad, clasificados cuatro de ellos como jóvenes, tres adultos y dos por encima de los ocho años.

○ Distribución geográfica

Se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre la amplificación de ADN de *A. phagocytophilum* en la muestra sanguínea de los animales y la **granja**, el **municipio** y la **zona** de procedencia ( $p<0,0001$ , en las tres variables) (**Imagen 11**).

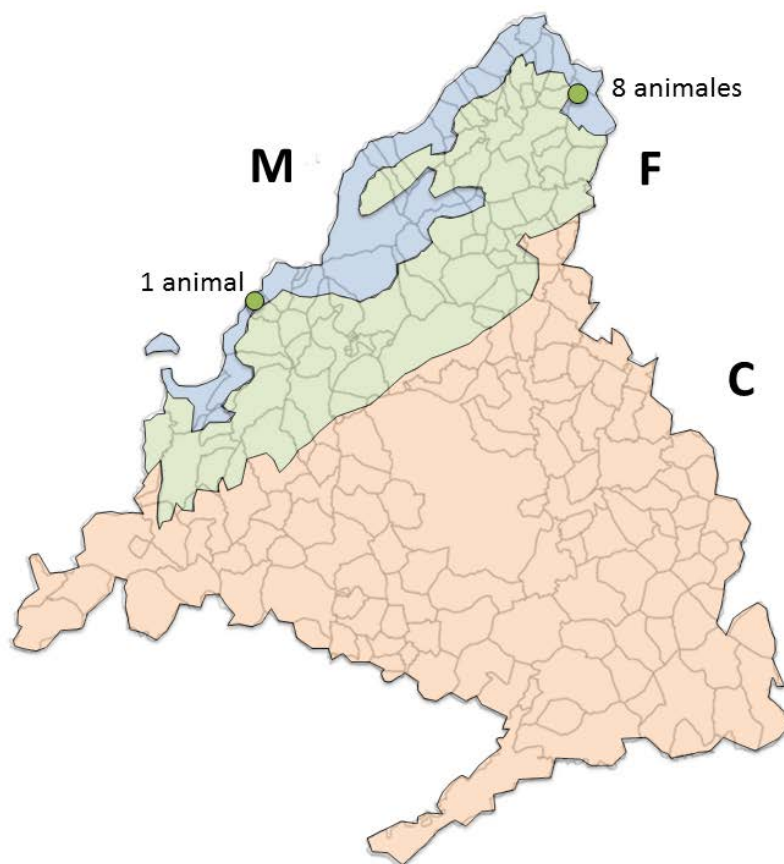


Imagen 11. Localización de las dos granjas positivas a *A. phagocytophilum*

Las dos granjas donde se detectó ADN de este agente (números 24 y 28) se encontraban en la zona de montaña (M), como se observa en la **Imagen 11**, lo que representa una prevalencia de *A. phagocytophilum* en la zona del 10,11% (9/89), no habiéndose detectado en ninguna de las granjas de las zonas de clima fresco (F) ni cálido (C).





metros de media en el resto de las granjas donde los animales no presentaron amplificación de ADN de este agente.

○ Momento de la recogida de las muestras

El **mes de recogida** y la **estación del año** de la recogida de las muestras estaban asociados estadísticamente ( $p=0,0168$  y  $p=0,0008$ , respectivamente) con la amplificación de ADN de *A. phagocytophilum*. Se detectó este agente en la muestra sanguínea de uno de los 58 animales que fueron incluidos en el estudio durante el mes de septiembre, y en ocho de los 157 bovinos muestreados durante el mes de octubre. Considerando que la muestra de septiembre fue tomada el día 17, en verano se amplificó ADN de este agente en un solo animal (1/19, 5,26%) y en otoño el resto de los animales positivos (8/203, 3,94%), si bien debe tenerse en cuenta que las muestras fueron tomadas con un intervalo de 18 días.

La **temperatura** en el momento de la toma de muestras no parece estar asociada estadísticamente con la presencia de *A. phagocytophilum* en este estudio ( $p=0,19$ ).

Sin embargo, cabe destacar que los animales positivos a este agente se encontraron a temperaturas medias inferiores ( $14,2 \pm 2,3^{\circ}\text{C}$ ) que los animales negativos ( $16 \pm 4,2^{\circ}\text{C}$ ). Las muestras se tomaron con una temperatura en el momento del muestreo de  $15^{\circ}\text{C}$  en la granja de Prádena del Rincón y de  $10^{\circ}\text{C}$  en la granja nº 24 de Los Molinos, mientras que en la granja nº 25 de Los Molinos, donde no se amplificó el agente, la temperatura registrada fue de  $20^{\circ}\text{C}$ .

Se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la amplificación de ADN del agente estudiado y la variable **humedad relativa** ( $p<0,0001$ ). Los animales en cuyas muestras sanguíneas se detectó ADN de *A. phagocytophilum* se encontraron con una de humedad relativa media superior ( $74,7 \pm 3,6\%$ ) que aquellos animales sin este agente ( $53,1 \pm 14,6\%$ ). Concretamente en la granja localizada en Prádena del Rincón la humedad fue del 76%. En el caso del municipio de Los Molinos, en la granja nº 24 donde se detectó un animal positivo a *A. phagocytophilum*, la humedad relativa registrada fue del 65%, a diferencia de la otra granja ubicada en el mismo municipio, la nº 25 donde no se detectó el agente, cuya humedad en el momento de la toma de muestras fue de 28%.

○ Características del sistema productivo de las granjas estudiadas

La variable **densidad** estaba asociada estadísticamente con la amplificación de ADN mediante PCR de *A. phagocytophilum* ( $p < 0,0001$ ), con una densidad media de  $0,14 \pm 0,02$  animales/ha en las granjas donde fue detectado este agente y de  $0,84 \pm 0,58$  animales/ha en las que no se detectó. Hay que tener en cuenta en el caso de la densidad que en estas dos granjas con presencia de *A. phagocytophilum* se encuentran entre las tres granjas con menor densidad animal del estudio.

En el caso de la variable **introducción de nuevos animales** al rebaño (**Tabla 36**), todos los animales positivos a *A. phagocytophilum* se encontraban en granjas que introducían sementales y novillas para reposición de otras granjas. El estudio estadístico de estos datos ha mostrado que existe un menor riesgo de infección por este agente en las granjas donde no se introducen animales externos ( $p = 0,033$ , OR=0,9, IC al 95% 0,95 a 0,99). Los animales introducidos en la granja de Prádena del Rincón, venían de Huesca, cerca de la frontera con Francia, y en el caso de Los Molinos, los animales fueron adquiridos en una explotación de Soto del Real, que cuenta con animales de pura raza rubia de Aquitania procedentes de Francia.

		PCR <i>A. phagocytophilum</i>			
			Positivo	Negativo	<b>Total</b>
Introducción de Animales	Sí	Frecuencia	9	305	314
		Porcentaje	2,87	97,13	100
	No	Frecuencia	0	154	154
		Porcentaje	0	100	100
	<b>Total</b>	Frecuencia	9	459	468
		Porcentaje	1,92	98,08	100

Tabla 36. Relación entre la amplificación de *A. phagocytophilum* y la introducción de animales

Todos los animales positivos a *A. phagocytophilum* **compartían pastos** con otros rebaños de vacas, tal y como puede observarse en la **Tabla 37**, confirmándose la existencia de un menor riesgo de infección por este agente en las granjas que no emplean pastos comunales ( $p < 0,0001$ , OR=0,9, IC al 95% de 0,89 a 0,98).

		PCR <i>A. phagocytophilum</i>			
			Positivo	Negativo	Total
Pastos	Compartidos	Frecuencia	9	131	140
		Porcentaje	6,43	93,57	100
		Frecuencia	0	328	328



	No compartidos	Porcentaje	0	100	100
	<b>Total</b>	Frecuencia	9	459	468
		Porcentaje	1,92	98,08	100

Tabla 37. Relación entre la amplificación de *A. phagocytophilum* y los pastos

- Presencia de garrapatas en el momento de la toma de muestras y tratamientos antiparasitarios empleados

Se encontró asociación entre la **presencia de garrapatas** en el momento del muestreo y la amplificación de ADN de este agente, pudiendo ser considerada la presencia de garrapatas como un factor de riesgo para la infección por *A. phagocytophilum* en el bovino ( $p=0,0009$ , OR=16,6, IC al 95% de 2,06 a 134,34) (**Tabla 38**).

		PCR <i>A. phagocytophilum</i>			
Presencia de Garrapatas	Sí		Positivo	Negativo	Total
		Frecuencia	8	158	166
	No	Porcentaje	4,82	95,18	100
		Frecuencia	1	329	330
	Total	Porcentaje	0,3	99,7	100
		Frecuencia	9	487	496
		Porcentaje	1,81	98,19	100

Tabla 38. Relación entre la amplificación de *A. phagocytophilum* y la presencia de garrapatas

Únicamente fue posible recoger garrapatas en el caso de los animales de la granja de Prádena del Rincón, que fueron identificadas por el Dr. Agustín Estrada-Peña como *Hyalomma scupense*.

En referencia a los tratamientos antiparasitarios empleados, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la prevalencia de *A. phagocytophilum* en función del **número de desparasitaciones al año** ( $p=0,06$ ). Tampoco se encontraron diferencias estadísticamente significativas en función del **fármaco antiparasitario** utilizado ( $p=0,08$ ) ni la **variable desparasitar** o no desparasitar ( $p=0,6$ ). Los animales con amplificación de ADN del agente de estas dos granjas recibían dos desparasitaciones al año con lactonas macrocíclicas.

- Historial de enfermedades transmitidas por garrapatas

Los ganaderos o responsables de los animales no describieron la existencia de signos clínicos de enfermedades transmitidas por garrapatas tales como fiebre, anorexia, palidez de mucosas o hematuria en las explotaciones donde se detectó este

agente. Asimismo, los animales que resultaron positivos a este agente mediante PCR no habían mostrado ni mostraron con posterioridad ningún signo clínico de enfermedad. En este sentido, el historial de casos clínicos previos de enfermedades de transmisión vectorial en la granja no se asoció con la amplificación de ADN de *A. phagocytophilum* ( $p=0,065$ ).

○ Contacto con animales de otras especies

▪ *Contacto con animales domésticos*

Con respecto al contacto con otras especies de **animales domésticos**, se encontró asociación con la amplificación de *A. phagocytophilum* ( $p=0,0037$ ,  $OR=0,96$ , IC al 95% de 0,93 a 0,98). La presencia de animales domésticos en la granja de procedencia de los animales puede ser considerada un factor de riesgo para la infección por *A. phagocytophilum*. Concretamente, las dos granjas donde se detectó el agente tenían contacto con caballos en las zonas donde pastaban (**Tabla 39**).

		PCR <i>A. phagocytophilum</i>			
			Positivo	Negativo	Total
Presencia de Animales Domésticos	Sí	Frecuencia	9	233	242
		Porcentaje	3,72	96,28	100
	No	Frecuencia	0	229	229
		Porcentaje	0	100	100
	Total	Frecuencia	9	462	471
		Porcentaje	1,91	98,09	100

Tabla 39. Relación entre la amplificación de *A. phagocytophilum* y la presencia de animales domésticos

▪ *Contacto con fauna silvestre*

En cuanto a la fauna silvestres, se encontró asociación entre la amplificación de *A. phagocytophilum* y la presencia de **carnívoros silvestres** ( $p=0,0016$ ,  $OR=0,9$ , IC al 95% de 0,293 a 0,98), **rumiantes silvestres** ( $p<0,014$ ,  $OR=0,9$ , IC al 95% de 0,95 a 0,98) y **aves rapaces** ( $p=0,0017$ ,  $OR=0,96$ , IC al 95% de 0,94 a 0,98) (**Tabla 40**).

En el caso de los **carnívoros silvestres**, los ganaderos describieron la presencia de zorros en las dos explotaciones en las que se detectó este agente, tejones en Los Molinos y lobos en Prádena del Rincón. La presencia de estos animales supone un factor de riesgo para el agente *A. phagocytophilum*. Los **rumiantes silvestres** presentes fueron corzos en ambas explotaciones y cabras montesas en Prádena del Rincón. La presencia de rumiantes silvestres es considerada un factor de riesgo para la

infección por *A. phagocytophilum* en los bovinos del estudio. En el caso de la presencia de **aves rapaces**, los ganaderos de ambas ganaderías confirmaron la presencia de buitres, pudiendo considerarse la presencia de estas rapaces como un factor de riesgo de padecer la infección por *A. phagocytophilum*. Asimismo, y aunque no se había considerado a la hora de realizar el estudio estadístico, se reflejó la presencia de cigüeñas en las dos granjas. En la **tabla 41**, el OR hace referencia al hecho de la no amplificación de ADN de *A. phagocytophilum* (96,34/100), es decir, que la presencia de aves rapaces es un factor de riesgo para *A. phagocytophilum*.

No se encontraron asociaciones estadísticas entre la amplificación de este agente y la **presencia de jabalíes** ( $p=0,36$ ), ni **conejos y liebres** ( $p=0,61$ ).

Resultados de la PCR de <i>A. phagocytophilum</i>				
Presencia de:		Número de animales positivos (porcentaje)	Número de animales negativos (porcentaje)	Número total de animales (porcentaje)
<b>Jabalíes</b>	Sí	9 (2,17%)	405 (97,83%)	414 (83,47%)
	No	0 (0%)	82 (100%)	82 (16,53%)
<b>Carnívoros silvestres</b>	Sí	9 (3,69%)	235 (96,31%)	244 (49,19%)
	No	0 (0%)	252 (100%)	252 (50,81%)
<b>Conejos y liebres</b>	Sí	9 (2,09%)	422 (97,91%)	431 (86,9%)
	No	0 (0%)	65 (100%)	65 (13,1%)
<b>Rumiantes silvestres</b>	Sí	9 (2,97%)	294 (97,03%)	303 (61%)
	No	0 (0%)	193 (100%)	193 (39%)
<b>Aves rapaces</b>	Sí	9 (3,66%)	237 (96,34%)	246 (49,6%)
	No	0 (0%)	250 (100%)	250 (50,4%)

Tabla 40. Relación entre la amplificación de *A. phagocytophilum* y la presencia de animales silvestres

#### 5.3.1.3. Relación entre la positividad a *A. phagocytophilum* y los resultados de la hematología y de la bioquímica sanguínea de los animales incluidos en el estudio

Fue posible realizar analítica sanguínea de los nueve animales en cuyas muestras sanguíneas se detectó ADN de este agente. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los **valores analíticos** de los animales con amplificación y sin amplificación de ADN del agente estudiado (**Tabla 41**).

Resultados de la PCR de <i>A. phagocytophilum</i>							
Parámetros Hematológicos	Animales positivos			Animales negativos			p
	Media ± DE	Mínimo	Máximo	Media ± DE	Mínimo	Máximo	

Glóbulos rojos (10 <sup>6</sup> /μl)	7,24 ± 1,54	4,33	8,86	7,09 ± 1,34	4,72	13,74	0,74
Hemoglobina (g/dl)	11,91 ± 2,28	8,50	15,20	12,34 ± 1,6	8,10	17,90	0,43
Hematocrito (%)	30,73 ± 5,68	21,60	38,40	31,78 ± 4,39	21,30	46,70	0,48
VCM (fl)	42,94 ± 4,34	37,20	49,90	45,43 ± 5,06	27,90	60,50	0,14
HCM (pg)	16,61 ± 1,59	14,30	19,70	17,68 ± 2,01	11,30	23,70	0,11
CHCM (g/dl)	38,69 ± 1,01	36,50	39,70	38,93 ± 1,02	35,80	43,50	0,49
Leucocitos (10 <sup>3</sup> /μl)	9,84 ± 2,56	4,70	13,40	9,10 ± 2,7	2,99	20,18	0,42
Neutrófilos (10 <sup>3</sup> /μl)	2,11 ± 0,58	1,40	3,40	2,48 ± 1,18	0,30	8,90	0,09
Linfocitos (10 <sup>3</sup> /μl)	6,35 ± 2,06	2,80	9,00	5,24 ± 2,16	0,60	13,10	0,13
Monocitos (10 <sup>3</sup> /μl)	0,38 ± 0,16	0,20	0,70	0,41 ± 0,23	0,00	1,80	0,66
Eosinófilos (10 <sup>3</sup> /μl)	0,91 ± 0,65	0,20	1,70	0,85 ± 0,51	0,10	2,90	0,75
Basófilos (10 <sup>3</sup> /μl)	0,08 ± 0,04	0,00	0,10	0,07 ± 0,06	0,00	0,50	0,81
Plaquetas (10 <sup>3</sup> /μl)	289,2 ± 122,7	81,00	494,00	248,3 ± 133,6	28,00	1203,00	0,36
AST (U/l)	106,6 ± 22,51	82,00	147,00	112,4 ± 144,8	52,00	1805,00	0,59
ALT (U/l)	42,11 ± 11,72	22,00	66,00	40,68 ± 31,0	8,00	394,00	0,74
Proteínas Totales (g/dl)	7,77 ± 1,03	6,50	9,20	7,5 ± 0,73	5,70	10,40	0,3

Tabla 41. Relación entre la amplificación de *A. phagocytophilum* y los parámetros hematológicos y bioquímicos sanguíneos (DE, desviación estándar)

Sin embargo, las analíticas de algunos de estos animales en cuyas muestras se amplificó ADN de *A. phagocytophilum* presentaron valores que se encontraban fuera del rango de referencia para la especie. En concreto, un animal (nº 357) presentó anemia, con  $4,33 \times 10^6$  eritrocitos/μl (rango de referencia de 5 a  $10 \times 10^6$ /μl) y un 21,6% de hematocrito (rango de referencia de 24 a 46%), junto a hiperproteinemia (9,2 g/dl, rango de referencia de 5,9 a 7,7 g/dl). Esta hiperproteinemia fue observada en otros cuatro animales positivos a la PCR frente a *A. phagocytophilum*, si bien los valores de proteínas variaron en estos casos entre 7,9 y 9,1 g/dl.

Por otra parte, otra de las vacas en cuya muestra sanguínea se amplificó ADN de *A. phagocytophilum* (nº 379) presentó leucocitosis ( $13,4 \times 10^3$  leucocitos/μl, rango de referencia: 4 a  $12 \times 10^3$  leucocitos/μl) con linfocitosis ( $9 \times 10^3$  /μl, rango de 2,5 a  $7,5 \times 10^3$  /μl). Este animal presentaba asimismo valores aumentados de AST (103 U/l; rango de referencia: 48-100 U/l) y ALT (66 U/l, rango de referencia: 17-37 U/l). En este sentido, cabe destacar que otros seis de los nueve animales positivos a *A.*

*phagocytophilum* presentaban ligeros incrementos de ALT, con valores de 38 a 45 U/l, unido en cuatro de ellos a aumentos de AST, con valores entre 117 y 147 U/l.

#### 5.3.2.4. Árbol de decisión de *A. phagocytophilum*

El mayor porcentaje de animales positivos (28,60%) se encuentra en zonas de montaña (M) con una humedad relativa por encima del 65%.

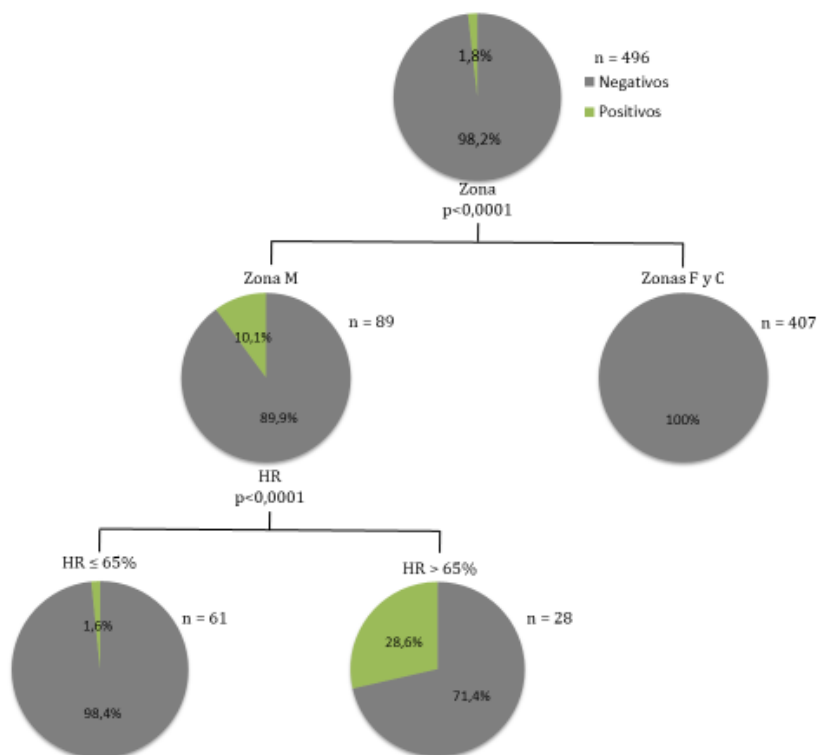


Imagen 13. Árbol de decisión de *A. phagocytophilum*

### **5.3.2. RESULTADOS DE LA PCR DE *Anaplasma marginale* EN LOS ANIMALES DE ESTUDIO**

#### 5.3.2.1. Prevalencia en la Comunidad de Madrid

El análisis mediante PCR de las muestras sanguíneas de los 496 animales incluidos en la presente tesis doctoral mostró una prevalencia de *Anaplasma marginale* del  $30,04 \pm 4,12\%$  (IC al 95% de 26 a 34,1%), tras la amplificación de ADN de este agente en un total de 149 bovinos pertenecientes a 21 de las 34 granjas incluidas en el estudio (el 61,74%). La prevalencia media en dichas granjas fue de 29,41%, con un valor mínimo de 7,14% y máximo de 85%.

*A. marginale* es el agente estudiado que más frecuentemente se detectó como agente único en los animales, sin amplificación de ADN de ningún otro agente de forma simultánea en la muestra sanguínea. Concretamente esta situación se produjo en 62/496 bovinos, lo que representa el 12,5% del total.

### 5.3.2.2. Relación entre la positividad frente a *A. marginale* y los datos epidemiológicos recogidos

#### ○ Relación de la prevalencia con los datos de la reseña de los animales

Se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre la **raza** y la amplificación de *A. marginale* ( $p < 0,0001$ ) (**Tabla 42**), con la mayor prevalencia detectada en la raza rubia gallega, con 19 positivos de los 24 animales de esta raza incluidos en el estudio (79,17%). Por el contrario, no se detectó ADN de este agente en los 26 bovinos de raza de lidia incluidos en el estudio y únicamente en uno de los 76 animales de raza frisona (1,32%).

		PCR <i>A. marginale</i>			
		Positivo	Negativo	Total	
Raza	Avileña-negra ibérica	Frecuencia	15	61	76
		Porcentaje	19,74	80,26	100
	Charolés	Frecuencia	13	7	20
		Porcentaje	65	35	100
	Frisona	Frecuencia	1	75	76
		Porcentaje	1,32	98,68	100
	Lidia	Frecuencia	0	26	26
		Porcentaje	0	100	100
	Limusín	Frecuencia	11	11	22
		Porcentaje	50	50	100
	Conjunto mestizo	Frecuencia	74	115	189
		Porcentaje	39,15	60,85	100
	Rubia de Aquitania	Frecuencia	4	33	37
		Porcentaje	10,81	89,19	100
	Rubia gallega	Frecuencia	19	5	24
		Porcentaje	79,17	20,83	100
	Otras razas	Frecuencia	12	13	25
		Porcentaje	48	52	100
Total	Frecuencia	149	346	495	
	Porcentaje	30,1	69,9	100	

Tabla 42. Relación entre la amplificación de *A. marginale* y la raza

No se encontró asociación entre el **sexo** y la amplificación de ADN de *A. marginale* ( $p=0,8$ ): en las hembras la prevalencia fue de 29,91% (140/468) y en los machos de 32,14% (9/28).

La **edad**, como variable categórica y como variable numérica, se asoció estadísticamente con la detección de *A. marginale* ( $p=0,0051$  y  $p=0,0023$ , respectivamente) (**Tabla 43** y **Gráfico 8**). Concretamente, los animales positivos a *A. marginale* tenían una media de edad de  $6,39 \pm 4,29$  años (0,62-17,47 años) y los animales negativos  $5,15 \pm 3,65$  años de media (0,35-18,33 años). Tal y como puede observarse en la **Tabla 43** y en el **Gráfico 8**, el grupo de edad que mostró una mayor prevalencia a *A. marginale* fue el grupo de los bovinos mayores de 8 años y, por el contrario, el grupo con menor detección del agente fue el de los menores de un año.

		PCR <i>A. marginale</i>			
		Positivo	Negativo	Total	
Grupos de Edad	Terneros (<1 año)	Frecuencia	2	13	15
		Porcentaje	13,33	86,67	100
	Jóvenes (1-3 años)	Frecuencia	37	98	135
		Porcentaje	27,41	72,59	100
	Adultos (>3-8 años)	Frecuencia	62	170	232
		Porcentaje	26,72	73,28	100
	Geriátricos (>8 años)	Frecuencia	48	63	111
		Porcentaje	43,24	56,76	100
Total	Frecuencia	149	344	493	
	Porcentaje	30,22	69,78	100	

Tabla 43. Relación entre la amplificación de *A. marginale* y los grupos de edad

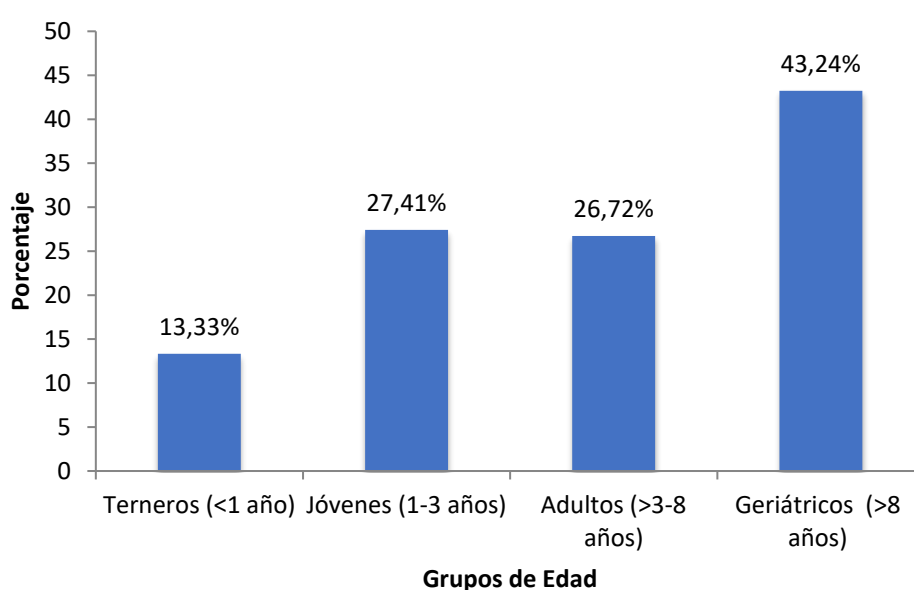


Gráfico 8. Porcentaje de animales positivos a *A. marginale* en los diferentes grupos de edad

○ Distribución geográfica

La **tabla 44** detalla la distribución de estos animales en función de la granja, municipio y zona a la que pertenecían.

Zona	Municipio	Número de animales positivos en relación al número de animales muestreados (porcentaje)	Nº de Granja	Número de animales positivos en relación al número de animales muestreados (porcentaje)	Número total de animales positivos en relación al número total de animales muestreados (porcentaje)
<b>M</b>	Bustarviejo	0/21 (0%)	<b>20</b>	0/21 (0%)	29/89 (32,58%)
	Cercedilla	0/14 (0%)	<b>4</b>	0/3 (0%)	
			<b>27</b>	0/11 (0%)	
	Los Molinos	4/16 (25%)	<b>24</b>	0/6 (0%)	
			<b>25</b>	4/10 (40%)	
	Prádena del Rincón	20/25 (80%)	<b>28</b>	20/25 (80%)	
<b>F</b>	Robledo de Chavela	4/6 (66,67%)*	<b>1</b>	4/6 (66,67%)	113/293 (38,57%)
	Somosierra	1/7 (14,29%)	<b>22</b>	1/7 (14,29%)	
	Becerril de la Sierra	2/11 (18,18%)	<b>6</b>	2/5 (40%)	
			<b>12</b>	0/6 (0%)	
	Cabanillas de la Sierra	21/30 (70%)	<b>29</b>	21/30 (70%)	
			<b>17</b>	0/15 (0%)	
	Collado Villalba	4/21 (19,05%)	<b>23</b>	4/6 (66,67%)	
			<b>30</b>	9/25 (36%)	
	Colmenar Viejo	9/25 (36%)	<b>30</b>	9/25 (36%)	
	El Boalo	3/19 (15,79%)	<b>11</b>	2/5 (40%)	
			<b>19</b>	1/14 (7,14%)	
	Fresnedillas de la Oliva	3/4 (75%)	<b>21</b>	3/4 (75%)	
	Gascones	29/45 (64,44%)	<b>13</b>	9/20 (45%)	
			<b>33</b>	20/25 (80%)	
	Guadarrama	0/10 (0%)	<b>8</b>	0/10 (0%)	
	Manzanares El Real	0/20 (0%)	<b>2</b>	0/20 (0%)	
	Mataelpino	0/3 (0%)	<b>3</b>	0/3 (0%)	
	Moralzarzal	0/2 (0%)	<b>7</b>	0/2 (0%)	
	Pedrezuela	17/20 (85%)	<b>5</b>	17/20 (85%)	
	Robledo de Chavela	8/31 (25,8%)*	<b>34</b>	7/17 (41,18%)	
			<b>35</b>	1/14 (7,14%)	
	Soto del Real	17/52 (32,69%)	<b>14</b>	3/31 (9,68%)	



			<b>31</b>	7/9 (77,78%)	
			<b>32</b>	7/12 (58,33%)	
<b>C</b>	Getafe	3/15 (20%)	<b>15</b>	3/15 (20%)	7/114 (6,14%)
	Navalagamella	0/25 (0%)	<b>26</b>	0/25 (0%)	
	Rivas-Vaciamadrid	0/50 (0%)	<b>18</b>	0/50 (0%)	
	Tres Cantos	4/10 (40%)	<b>10</b>	4/10 (40%)	
	Villamantilla	0/14 (0%)	<b>9</b>	0/14 (0%)	

Tabla 44. Prevalencia de *A. marginale* en los diferentes municipios y granjas muestreados

\*Dos de las tres granjas muestreadas del municipio de Robledo de Chavela pertenecen a la zona F y una a la zona M

El estudio estadístico de los datos mostró una asociación estadísticamente significativa entre la **granja** de procedencia de los animales y la positividad frente a *A. marginale* ( $p < 0,0001$ ). En 13 granjas no se detectó *A. marginale*, mientras que cuatro mostraron prevalencias superiores al 75%, con la mayor prevalencia detectada en la granja nº 5, con 17 de los 20 animales muestreados positivos al agente (85%).

Por otra parte, se detectó la presencia de ADN de *A. marginale* en 15 de los 24 municipios en donde se realizó el muestreo, con prevalencias que varían entre el 14,29% de Somosierra y el 85% de Pedrezuela, tal y como puede observarse en la **Tabla 44 e Imagen 14**, con una influencia estadísticamente significativa del **municipio** donde se encontraban los animales en la detección de este agente ( $p < 0,0001$ ).

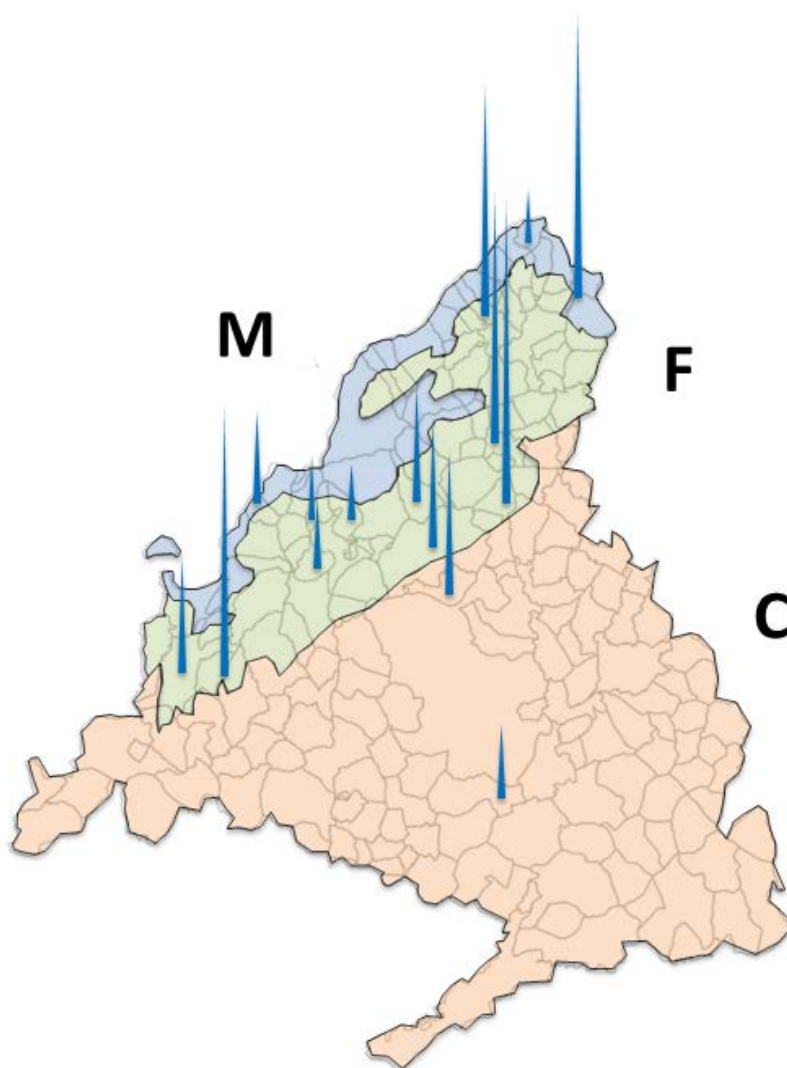


Imagen 14. Mapa con los municipios y su prevalencia de *A. marginale*

El estudio de los datos mostró la existencia de una asociación estadísticamente significativa entre la **zona** en la que se encontraba localizada la granja de procedencia de los animales y la amplificación de ADN de *A. marginale* ( $p < 0,0001$ , **Tabla 44**).

Concretamente, se comprobó la existencia de una menor prevalencia en la zona cálida (C) en comparación con la zona de montaña (M,  $p < 0,0001$ ) y la zona fresca (F,  $p < 0,0001$ ).

Se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre el agente estudiado y la variable **altitud** ( $p < 0,0001$ ): los animales positivos a *A. marginale* se situaron a una altitud media superior ( $1.009,6 \pm 149,2$  metros) que los animales sin amplificación de ADN de este agente ( $900 \pm 235,9$  metros).

○ Momento de la recogida de las muestras

El **mes de recogida** de las muestras y la **estación del año** estaban asociados estadísticamente con la amplificación de ADN de *A. marginale* ( $p < 0,0001$  en ambos casos, **Tablas 45 y 46**, y **Gráfico 9**). En los meses de abril y octubre se detectó la mayor prevalencia de *A. marginale* (40,38% y 58,6%, respectivamente), y en cuanto a las estaciones, el otoño fue la estación con mayor número de animales positivos (47,29%).

		PCR <i>A. marginale</i>			
		Positivo	Negativo	Total	
Mes de Recogida	Abril	Frecuencia	21	31	52
		Porcentaje	40,38	59,62	100
	Mayo	Frecuencia	23	160	183
		Porcentaje	12,57	87,43	100
	Junio	Frecuencia	4	35	39
		Porcentaje	10,26	89,74	100
	Agosto	Frecuencia	1	6	7
		Porcentaje	14,29	85,71	100
	Septiembre	Frecuencia	8	50	58
		Porcentaje	13,79	86,21	100
	Octubre	Frecuencia	92	65	157
		Porcentaje	58,6	41,4	100
	Total	Frecuencia	149	347	496
		Porcentaje	30,04	69,96	100

Tabla 45. Relación entre la amplificación de *A. marginale* y el mes de la toma de muestras

		PCR <i>A. marginale</i>			
			Positivo	Negativo	<b>Total</b>
Estación del Año	Otoño	Frecuencia	96	107	203
		Porcentaje	47,29	52,71	100
	Primavera	Frecuencia	48	226	274
		Porcentaje	17,52	82,48	100
	Verano	Frecuencia	5	14	19
		Porcentaje	26,32	73,68	100
	<b>Total</b>	Frecuencia	149	347	496
		Porcentaje	30,04	69,96	100

Tabla 46. Relación entre la amplificación de *A. marginale* y la estación del año

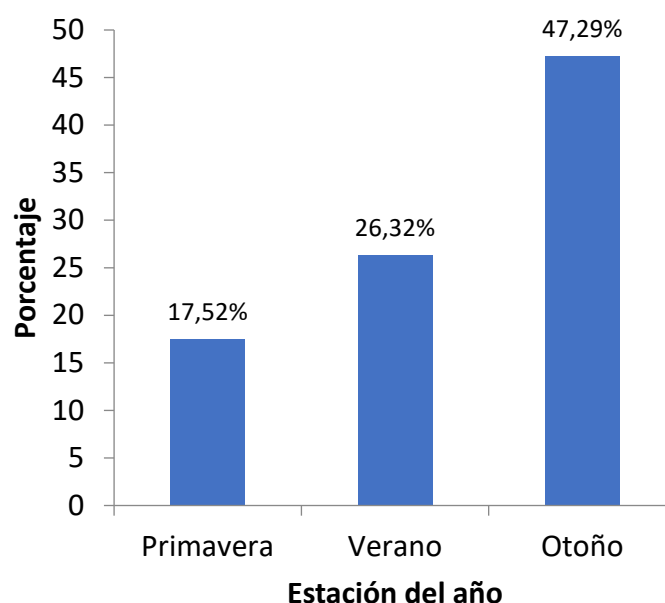


Gráfico 9. Porcentaje de animales positivos a *A. marginale* en relación con la estación del año

Se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre el agente estudiado y las variables **temperatura** y **humedad relativa** ( $p < 0,0001$ , en ambas).

En el momento de la toma de muestras, la temperatura media fue inferior en el caso de los animales positivos a la PCR de este agente, con una media de  $14 \pm 3,79^{\circ}\text{C}$ , mientras que los animales negativos tuvieron una temperatura media de  $16,8 \pm 4,06^{\circ}\text{C}$ . La humedad relativa media fue de  $61 \pm 13,3\%$  en el momento de la toma de muestra de los animales que resultaron positivos a la PCR de *A. marginale*, encontrándose por encima de la humedad relativa media de  $50 \pm 14,21\%$  registrada en los animales sin amplificación de ADN a este agente.

#### ○ Características del sistema productivo de las granjas estudiadas

La amplificación de ADN de *A. marginale* se asoció estadísticamente con una menor **densidad** de animales ( $p = 0,0014$ ), con un valor medio de  $0,68 \pm 0,57$  bóvidos/ha, a diferencia de los animales con resultados negativos para esta PCR, para los que la densidad media fue de  $0,88 \pm 0,57$  bóvidos/ha.

No hubo diferencias estadísticamente significativas en la prevalencia de *A. marginale* si los bovinos procedían de granjas en las que había **introducción de nuevos animales** (con diez positivos de 314, 32,48% de prevalencia) o de granjas en las que la reposición se hacía con los individuos de la propia explotación (con 44 animales positivos de 154, 28,57% de prevalencia) ( $p = 0,39$ ).

**Compartir pastos** con otras ganaderías de vacuno se asoció estadísticamente con la amplificación del agente ( $p<0,0001$ ,  $OR=4,8$ , IC al 95% de 3,13 a 7,37, **Tabla 47**), pudiendo considerarse un factor de riesgo para la infección por *A. marginale*.

			PCR <i>A. marginale</i>		
			Positivo	Negativo	Total
Pastos	Compartidos	Frecuencia	78	62	140
		Porcentaje	55,71	44,29	100
	No compartidos	Frecuencia	68	260	328
		Porcentaje	20,73	79,27	100
	Total	Frecuencia	146	322	468
		Porcentaje	31,2	68,8	100

Tabla 47. Relación entre la amplificación de *A. marginale* y los pastos

- Presencia de garrapatas en el momento de la toma de muestras y tratamientos antiparasitarios empleados

No se encontró asociación entre la **presencia de garrapatas** en el momento del muestreo con la amplificación de *A. marginale* ( $p=0,391$ ). Concretamente la prevalencia de *A. marginale* fue del 32,53% (54/166) entre los animales pertenecientes a granjas que presentaban garrapatas en el momento del muestreo y el 28,79% (95/330) para los que no se encontraron en presencia de garrapatas.

Los animales procedes de explotaciones que **desparasitaban** tenían un mayor riesgo de infección por *A. marginale*, con un 34,41% (149/433) frente a un 0% ( $p<0,0001$ ,  $OR=0,65$ , IC al 95% de 0,61 a 0,70, **Tabla 48**).

			PCR <i>A. marginale</i>		
			Positivo	Negativo	Total
Desparasitar	Sí	Frecuencia	149	284	433
		Porcentaje	34,41	65,59	100
	No	Frecuencia	0	60	60
		Porcentaje	0	100	100
	Total	Frecuencia	149	344	493
		Porcentaje	30,22	69,78	100

Tabla 48. Relación entre la amplificación de *A. marginale* y el evento desparasitar

De forma relacionada, el **número de desparasitaciones al año** se asoció estadísticamente con la detección de ADN de *A. marginale* mediante PCR ( $p<0,0001$ ), con un mayor porcentaje de prevalencia en las granjas con mayor número de desparasitaciones al año, tal y como puede observarse en la **Tabla 49** y **Gráfico 10**.

			PCR <i>A. marginale</i>		
			Positivo	Negativo	Total
Número de desparasitaciones al año	Ninguna	Frecuencia	0	60	60
		Porcentaje	0	100	100
	1 vez al año	Frecuencia	31	104	135
		Porcentaje	22,96	77,04	100
	2 veces al año	Frecuencia	97	165	262
		Porcentaje	37,02	62,98	100
	Más de 2 veces al año	Frecuencia	21	15	36
		Porcentaje	58,33	41,67	100
	Total	Frecuencia	149	344	493
		Porcentaje	30,22	69,78	100

Tabla 49. Relación entre la amplificación de *A. marginale* y número de desparasitaciones al año

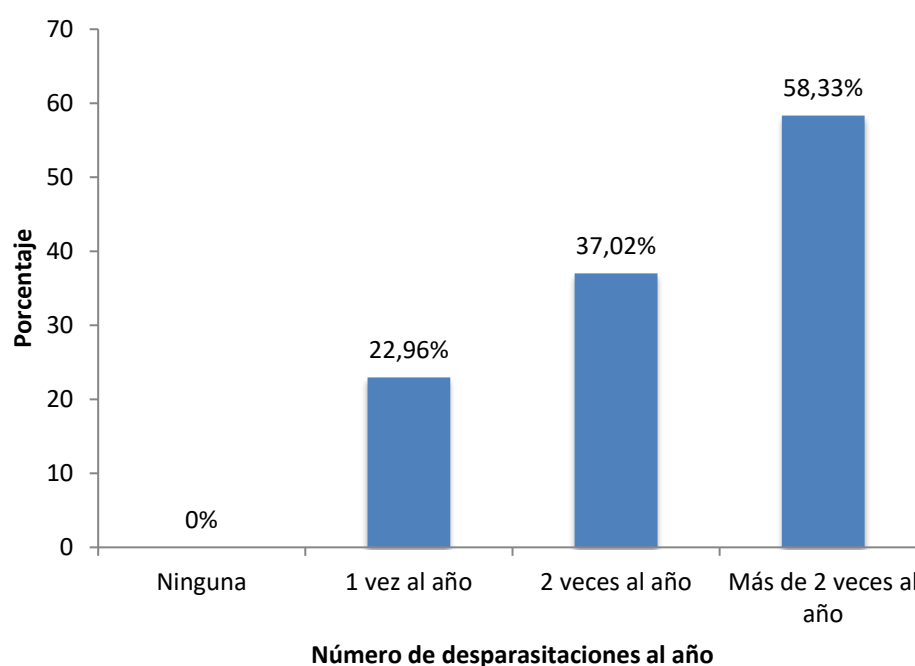


Gráfico 10. Porcentaje de animales positivos a *A. marginale* en función del número de desparasitaciones al año

Cuando se analizó esta variable desde el punto de vista cuantitativo, también se encontraron diferencias significativas ( $p < 0,0001$ ). Se determinó que los animales con amplificación de ADN de *A. marginale* presentaron de media  $2,07 \pm 0,87$  desparasitaciones al año frente a los animales que no presentaron amplificación, con una media de  $1,43 \pm 0,92$  desparasitaciones al año.

El fármaco empleado en la desparasitación también mostró una asociación estadísticamente significativa para un nivel de confianza del 95% con la detección de *A. marginale* mediante PCR en las muestras sanguíneas de los animales ( $p < 0,0001$ , **Tabla 50** y **Gráfico 11**). Concretamente se comprobó una mayor prevalencia de

infección por este agente en animales que eran desparasitados empleando la combinación de piretroides y lactonas macrocíclicas, seguido del uso exclusivo de alguno de estos dos tipos de productos.

		PCR <i>A. marginale</i>		
		Positivo	Negativo	Total
Número de desparasitaciones al año	Ninguno	Frecuencia	0	60
		Porcentaje	0	100
	Piretroides	Frecuencia	10	38
		Porcentaje	26,32	100
	Lactonas macrocíclicas	Frecuencia	78	226
		Porcentaje	34,51	100
	Piretroides y L. Macrocíclicas	Frecuencia	58	113
		Porcentaje	51,33	100
	Piretroides, L. Macrocíclicas y Organofosforados	Frecuencia	3	31
		Porcentaje	9,68	100
	<b>Total</b>	Frecuencia	149	468
		Porcentaje	31,84	100

Tabla 50. Relación entre la amplificación de *A. marginale* y el fármaco empleado como antiparasitario

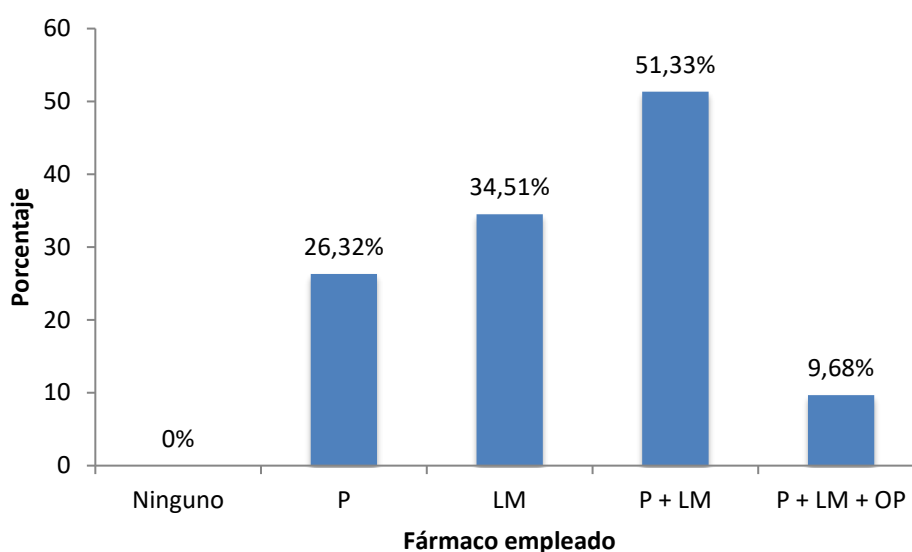


Gráfico 11. Porcentaje de animales positivos a *A. marginale* en relación con el fármaco utilizado (P, piretroides; LM, lactonas macrocíclicas y OP, organofosforados)

#### ○ Historial de enfermedades transmitidas por garrapatas

La descripción en la granja de **casos previos** con signos clínicos característicos de enfermedades de transmisión vectorial en el ganado (como palidez de mucosas, ictericia, hematuria o hemoglobinuria, linfadenomegalia, fiebre, bajada de la

producción de leche o abortos en hembras gestantes) se asoció estadísticamente con la amplificación de ADN de *A. marginale* ( $p=0,0036$ ,  $OR=1,8$ , IC al 95% de 1,22 a 2,82).

En la **Tabla 51** observamos que el 41,04% (55/134) de los animales de granjas donde se registraron casos clínicos previos presentaron amplificación del ADN del agente, mientras que en las granjas sin historial de estas enfermedades la prevalencia era del 27,25% (91/334).

			PCR <i>A. marginale</i>		
			Positivo	Negativo	Total
Casos Previos	Sí	Frecuencia	55	79	134
		Porcentaje	41,04	58,96	100
	No	Frecuencia	91	243	334
		Porcentaje	27,25	72,75	100
	Total	Frecuencia	146	322	468
		Porcentaje	31,2	68,8	100

Tabla 51. Relación entre la amplificación de *A. marginale* y los casos previos

○ Contacto con animales de otras especies

▪ *Contacto con otros animales domésticos*

Se encontró asociación estadísticamente significativa entre la detección de *A. marginale* en las muestras sanguíneas de los bovinos y la presencia de otros **animales domésticos** ( $p=0,0281$ ,  $OR=0,64$ , IC al 95% de 0,43 a 0,95), tal y como puede observarse en la **Tabla 52**.

			PCR <i>A. marginale</i>		
			Positivo	Negativo	Total
Presencia de Animales Domésticos	Sí	Frecuencia	64	178	242
		Porcentaje	26,45	73,55	100
	No	Frecuencia	82	147	229
		Porcentaje	35,81	64,19	100
	Total	Frecuencia	146	325	471
		Porcentaje	31	69	100

Tabla 52. Relación entre la amplificación de *A. marginale* y la presencia de animales domésticos

▪ *Contacto con fauna silvestre*

Con respecto al contacto con **animales silvestres**, se encontró asociación estadísticamente significativa entre la detección de *A. marginale* en las muestras sanguíneas de los animales y la fauna presente, tal y como puede observarse en la **Tabla 53**. Concretamente, se encontró una mayor prevalencia de *A. marginale* cuando



los ganaderos o responsables de los animales describían la presencia de jabalíes ( $p=0,0228$ ,  $OR=1,9$ , IC al 95% de 1,08 a 3,50) y/o rumiantes silvestres ( $p<0,0001$ ,  $OR=2,8$ , IC al 95% de 1,84 a 4,42). Por el contrario, la presencia de carnívoros silvestres ( $p<0,0001$ ,  $OR=0,3$ , IC al 95% de 0,25 a 0,57), conejos y liebres ( $p=0,0139$ ,  $OR=0,5$ , IC al 95% de 0,30 a 0,87) y aves rapaces ( $p<0,0001$ ,  $OR=0,23$ , IC al 95% de 0,15 a 0,36) se asoció estadísticamente con una menor prevalencia de *A. marginale*.

Resultados de la PCR de <i>A. marginale</i>				
Presencia de:		Número de animales positivos (porcentaje)	Número de animales negativos (porcentaje)	Número total de animales (porcentaje)
Jabalíes	Sí	133 (32,13%)	281 (67,87%)	414 (83,47%)
	No	16 (19,51%)	66 (80,49%)	82 (16,53%)
Carnívoros silvestres	Sí	49 (20,08%)	195 (79,92%)	244 (49,19%)
	No	100 (39,68%)	152 (60,32%)	252 (50,81%)
Conejos y liebres	Sí	121 (28,07%)	310 (71,93%)	431 (86,9%)
	No	28 (43,08%)	37 (56,92%)	65 (13,1%)
Rumiantes silvestres	Sí	115 (37,95%)	188 (62,05%)	303 (61%)
	No	34 (17,62%)	159 (82,38%)	193 (39%)
Aves rapaces	Sí	39 (15,85%)	207 (84,15%)	246 (49,6%)
	No	110 (44%)	140 (56%)	250 (50,4%)

Tabla 53. Relación entre la amplificación de *A. marginales* y la presencia de animales silvestres

### 5.3.2.3. Relación entre la positividad a *A. marginale* y los resultados de la hematología y de la bioquímica sanguínea de los animales incluidos en el estudio

En la siguiente tabla se observan los **valores analíticos** de los animales con amplificación y sin amplificación del agente estudiado (Tabla 54).

Resultados de la PCR de <i>A. marginale</i>							
Parámetros Hematológicos	Animales positivos			Animales negativos			p
	Media $\pm$ DE	Mínimo	Máximo	Media $\pm$ DE	Mínimo	Máximo	
Glóbulos rojos ( $10^6/\mu\text{l}$ )	6,96 $\pm$ 1,18	4,33	11,16	7,14 $\pm$ 1,40	4,72	13,74	0,23
Hemoglobina (g/dl)	12,24 $\pm$ 1,52	8,20	17,30	12,36 $\pm$ 1,65	8,10	17,90	0,53
Hematocrito (%)	31,63 $\pm$ 4,04	21,60	43,90	31,80 $\pm$ 4,57	21,30	46,70	0,73
VCM (fl)	45,85 $\pm$ 4,46	31,50	60,50	45,16 $\pm$ 5,26	29,90	59,50	0,25
HCM (pg)	17,76 $\pm$ 1,77	12,60	23,70	17,61 $\pm$ 2,10	11,30	23,60	0,52

CHCM (g/dl)	38,74 ± 0,97	36,20	41,00	38,99 ± 1,02	35,80	43,50	0,03
Leucocitos (10 <sup>3</sup> /μl)	9,52 ± 2,67	4,70	16,66	8,96 ± 2,69	2,99	20,18	0,07
Neutrófilos (10 <sup>3</sup> /μl)	2,44 ± 1,21	0,50	8,90	2,49 ± 1,14	0,30	7,20	0,72
Linfocitos (10 <sup>3</sup> /μl)	5,60 ± 2,25	1,00	11,40	5,13 ± 2,11	0,60	13,10	0,06
Monocitos (10 <sup>3</sup> /μl)	0,39 ± 0,20	0,10	1,00	0,41 ± 0,23	0,00	1,80	0,5
Eosinófilos (10 <sup>3</sup> /μl)	0,97 ± 0,55	0,20	2,90	0,80 ± 0,48	0,10	2,80	0,005
Basófilos (10 <sup>3</sup> /μl)	0,06 ± 0,04	0,00	0,20	0,07 ± 0,06	0,00	0,50	0,37
Plaquetas (10 <sup>3</sup> /μl)	219,5 ± 100,1	35,00	474,00	261,6 ± 143,0	28,00	1203,00	0,002
AST (U/l)	99,50 ± 36,97	54,00	343,00	117,4 ± 167,5	52,00	1805,00	0,11
ALT (U/l)	39,94 ± 13,87	12,00	99,00	41,02 ± 35,25	8,00	394,00	0,67
Proteínas Totales (g/dl)	7,54 ± 0,75	6,00	9,20	7,50 ± 0,73	5,70	10,40	0,61

Tabla 54. Relación entre la amplificación de *A. marginale* y los parámetros hematológicos y bioquímicos sanguíneos (DE, desviación estándar. Se resaltan en negrita los valores de p inferiores a 0,05)

Los valores medios del hemograma se encuentran dentro del rango de referencia. El estudio estadístico de estos datos ha mostrado que el valor de CHCM y el recuento de plaquetas es menor estadísticamente en los animales positivos mediante PCR a *A. marginale* que en los negativos ( $p=0,03$  y  $p=0,002$ , respectivamente). En cambio, el recuento de eosinófilos resulta estadísticamente superior en los animales positivos a *A. marginale* ( $p=0,005$ ), si bien únicamente tres de las vacas positivas presentaron valores por encima del límite superior. Además, aunque de forma no significativa, en los animales con amplificación de ADN de *A. marginale* en las muestras sanguíneas los recuentos de leucocitos totales y de linfocitos se encontraron por encima de los valores medios de estos parámetros en los animales negativos a esta PCR. Concretamente 17 de los 101 bovinos positivos a *A. marginale* de los que se dispone de analítica sanguínea presentaron leucocitosis por linfocitosis.

En el caso de los parámetros de la bioquímica sanguínea, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los bovinos positivos a *A. marginale* y los negativos para las enzimas hepáticas AST y ALT ni para las proteínas totales.

#### 5.3.2.4. Árbol de decisión de *A. marginale*

El mayor porcentaje de animales positivos (81,8%) pertenecen a las razas conjunto mestizo, limusín y el grupo de otras razas que se encuentran en zonas con una

humedad relativa media mayor del 65% y a una temperatura media mayor a 14°C (Imagen 15).

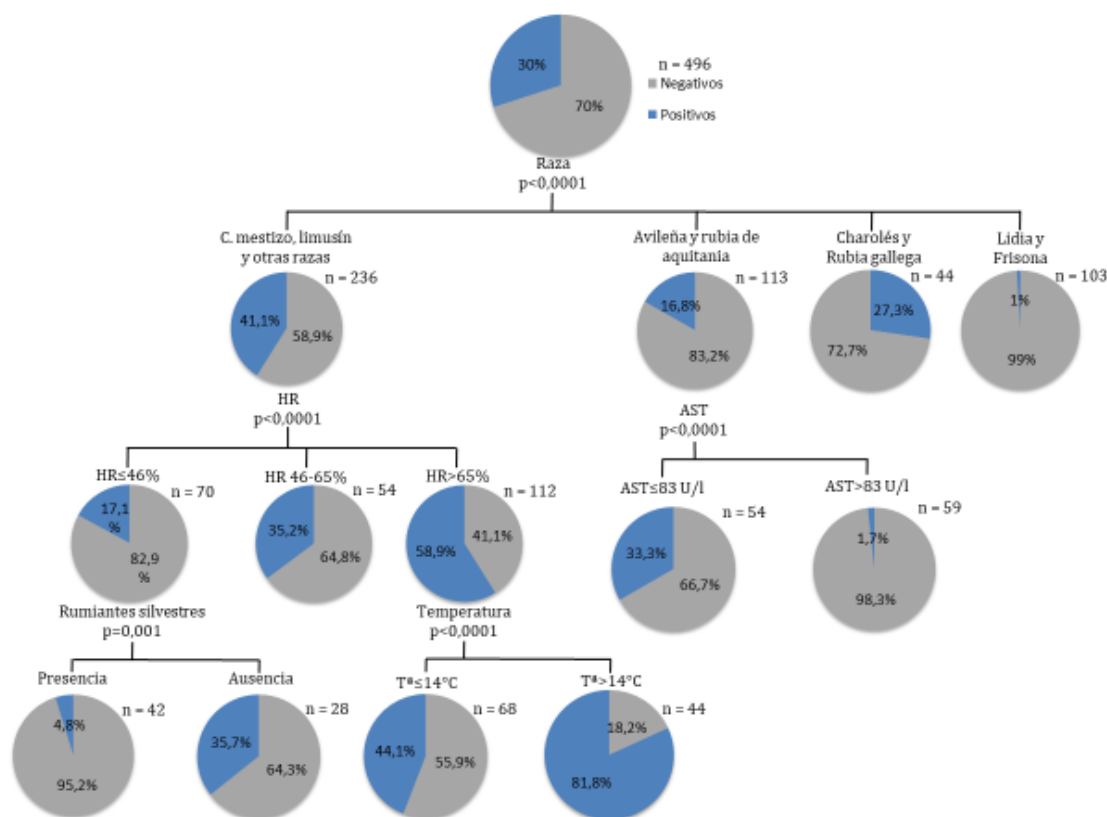


Imagen 15. Árbol de decisión de *A. marginale*

### **5.3.3. RESULTADOS DE LA PCR DE *Anaplasma centrale* EN LOS ANIMALES DEL ESTUDIO**

No se obtuvo amplificación de ADN de *A. centrale* en ningún animal incluido en el estudio mediante la técnica de PCR empleada en esta tesis doctoral.

### **5.3.4. RESULTADOS DE LA PCR DE *Babesia bigemina* EN LOS ANIMALES DE ESTUDIO**

#### **5.3.4.1. Prevalencia en la Comunidad de Madrid**

El análisis mediante PCR de las muestras sanguíneas de los 496 animales incluidos en la presente tesis doctoral mostró una prevalencia de *Babesia bigemina* del  $21,98 \pm 3,72\%$  (IC al 95% de 18,3 a 25,6%), tras la amplificación de ADN de este agente en un total de 109 animales, pertenecientes a 20 de las 34 granjas incluidas en el

estudio (el 58,85% de las granjas). La prevalencia media en dichas granjas fue de 20,16%, con un valor mínimo de 10% y máximo de 70%.

*B. bigemina* se detectó como agente único en 48 animales, lo que representa un 9,7% del total.

#### 5.3.4.2. Relación entre la positividad a *B. bigemina* y los datos epidemiológicos recogidos

##### ○ Relación de la prevalencia con los datos de la reseña de los animales

Se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre la **raza** y la amplificación de *B. bigemina* ( $p < 0,0001$ , **Tabla 55**). La raza charolés presentó la mayor prevalencia, con 11 positivos de los 20 animales de esta raza incluidos en el estudio (55%). Por el contrario, no se detectó ADN de este agente ni en los 26 bovinos de raza de lidia ni en los 76 animales de raza frisona.

		PCR <i>B. bigemina</i>			
		Positivo	Negativo	Total	
Raza	Avileña-negra ibérica	Frecuencia	30	46	76
		Porcentaje	39,47	60,53	100
	Charolés	Frecuencia	11	9	20
		Porcentaje	55	45	100
	Frisona	Frecuencia	0	76	76
		Porcentaje	0	100	100
	Lidia	Frecuencia	0	26	26
		Porcentaje	0	100	100
	Limusín	Frecuencia	6	16	22
		Porcentaje	27,27	72,73	100
	Conjunto mestizo	Frecuencia	38	151	189
		Porcentaje	20,11	79,89	100
	Rubia de Aquitania	Frecuencia	8	29	37
		Porcentaje	21,62	78,38	100
	Rubia gallega	Frecuencia	9	15	24
		Porcentaje	37,5	62,5	100
	Otras razas	Frecuencia	6	19	25
		Porcentaje	24	76	100
Total	Frecuencia	108	387	495	
	Porcentaje	21,82	78,18	100	

Tabla 55. Relación entre la amplificación de *B. bigemina* y la raza

El **sexo** estaba asociado estadísticamente con la amplificación de ADN de *B. bigemina* ( $p=0,0013$ ,  $OR=0,29$ , IC al 95% de 0,13 a 0,64). En la **Tabla 56** se observa que los machos presentaron una prevalencia mayor (46,43%) que las hembras (20,51%).

		PCR <i>B. bigemina</i>			
		Positivo	Negativo	Total	
Sexo	Hembra	Frecuencia	96	372	468
		Porcentaje	20,51	79,49	100
	Macho	Frecuencia	13	15	28
		Porcentaje	46,43	53,57	100
	Total	Frecuencia	109	387	496
		Porcentaje	21,98	82,69	100

Tabla 56. Relación entre la amplificación de *B. bigemina* y el sexo

La **edad**, como variable categórica y como variable numérica se asoció estadísticamente con la detección de ADN de *B. bigemina* ( $p=0,0002$  y  $p=0,0017$ , respectivamente). Los animales positivos al agente presentaron una media de edad de  $4,48 \pm 3,51$  años (0,35-18,10 años) y los animales negativos  $5,81 \pm 3,95$  años de media (0,48-18,33 años). Tal como se observa en la **Tabla 57** y el **Gráfico 12**, el grupo de edad que mostró mayor prevalencia fue el grupo de los terneros, animales menores de un año (60%), mientras que la menor prevalencia se dio en el grupo de animales mayores de ocho años (15,32%).

		PCR <i>B. bigemina</i>			
		Positivo	Negativo	Total	
Grupos de Edad	Terneros (<1 año)	Frecuencia	9	6	15
		Porcentaje	60	40	100
	Jóvenes (1-3 años)	Frecuencia	37	98	135
		Porcentaje	27,41	72,59	100
	Adultos (>3-8 años)	Frecuencia	44	188	232
		Porcentaje	18,97	81,03	100
	Geriátricos (>8 años)	Frecuencia	17	94	111
		Porcentaje	15,32	84,68	100
Total	Frecuencia	107	386	493	
	Porcentaje	21,7	78,3	100	

Tabla 57. Relación entre la amplificación de *B. bigemina* y los grupos de edad

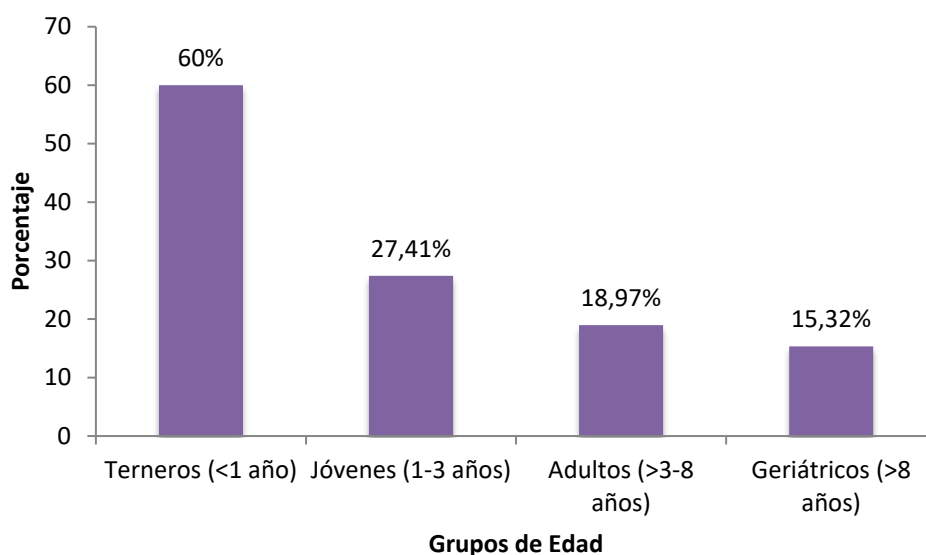


Gráfico 12. Porcentaje de animales positivos a *B. bigemina* en los diferentes grupos de edad

○ Distribución geográfica

En la **tabla 58** se detalla la distribución de los animales en cuyas muestras sanguíneas se detectó ADN de *B. bigemina* en función de la granja, municipio y zona a la que pertenecían.

Zona	Municipio	Número de animales positivos en relación al número de animales muestreados (porcentaje)	Nº de Granja	Número de animales positivos en relación al número de animales muestreados (porcentaje)	Número total de animales positivos en relación al número total de animales muestreados (porcentaje)
<b>M</b>	Bustarviejo	8/21 (38,1%)	20	8/21 (38,1%)	27/89 (30,34%)
	Cercedilla	0/14 (0%)	4	0/3 (0%)	
			27	0/11 (0%)	
	Los Molinos	4/16 (25%)	24	0/6 (0%)	
			25	4/10 (40%)	
	Prádena del Rincón	12/25 (48%)	28	12/25 (48%)	
	Robledo de Chavela	3/6 (50%)*	1	3/6 (50%)	
	Somosierra	0/7 (0%)	22	0/7 (0%)	
<b>F</b>	Becerril de la Sierra	2/11 (18,18%)	6	2/5 (40%)	79/293 (26,96%)
			12	0/6 (0%)	
	Cabanillas de la Sierra	9/30 (30%)	29	9/30 (30%)	

	Collado Villalba	0/21 (0%)	17	0/15 (0%)	
			23	0/6 (0%)	
	Colmenar Viejo	4/25 (16%)	30	4/25 (16%)	
	El Boalo	1/19 (5,26%)	11	1/5 (20%)	
			19	0/14 (0%)	
	Fresnedillas de la Oliva	1/4 (25%)	21	1/4 (25%)	
	Gascones	23/45 (51,11%)	13	14/20 (70%)	
			33	9/25 (36%)	
	Guadarrama	0/10 (0%)	8	0/10 (0%)	
	Manzanares El Real	11/20 (55%)	2	11/20 (55%)	
	Mataelpino	1/3 (33,33%)	3	1/3 (33,33%)	
	Moralzarzal	0/2 (0%)	7	0/2 (0%)	
	Pedrezuela	9/20 (45%)	5	9/20 (45%)	
	Robledo de Chavela	3/31 (9,67%)*	34	3/17 (17,65%)	
			35	0/14 (0%)	
	Soto del Real	15/52 (28,85%)	14	8/31 (25,81%)	
			31	5/9 (55,56%)	
			32	2/12 (16,67%)	
C	Getafe	2/15 (13,33%)	15	2/15 (13,33%)	3/114 (2,63%)
	Navalagamella	0/25 (0%)	26	0/25 (0%)	
	Rivas-Vaciamadrid	0/50 (0%)	18	0/50 (0%)	
	Tres Cantos	1/10 (10%)	10	1/10 (10%)	
	Villamantilla	0/14 (0%)	9	0/14 (0%)	

Tabla 58. Prevalencia de *B. bigemina* en los diferentes municipios y granjas muestreados

\*Dos de las tres granjas muestreadas del municipio de Robledo de Chavela pertenecen a la zona F y una a la zona M

La **granja** de procedencia de los animales estaba asociada estadísticamente con la amplificación de ADN de *B. bigemina* ( $p < 0,0001$ ). En 14 granjas no se amplificó el agente, mientras que cuatro granjas presentaron una prevalencia por encima del 50%. Concretamente la prevalencia máxima fue del 70% en la granja nº 13, con 14 positivos entre los 20 animales muestreados.

Con respecto a los **municipios**, se encontró asociación estadísticamente significativa, detectándose la presencia de ADN de *B. bigemina* en 16 de los 24 municipios muestreados, con prevalencias que varían del 5,26% al 55%, en El Boalo y Manzanares El Real, respectivamente ( $p < 0,0001$ , **Tabla 58**).

El estudio de los datos mostró una asociación estadísticamente significativa entre la **zona** en la que se encontraba la granja de los animales muestreados y la amplificación de ADN de *B. bigemina* ( $p < 0,0001$ , **Tabla 58** e **Imagen 16**). La zona cálida

(C) presentó una menor prevalencia en comparación con la zona de montaña (M) y la zona fresca (F) que fue estadísticamente significativa ( $p < 0,0001$  en ambos casos).

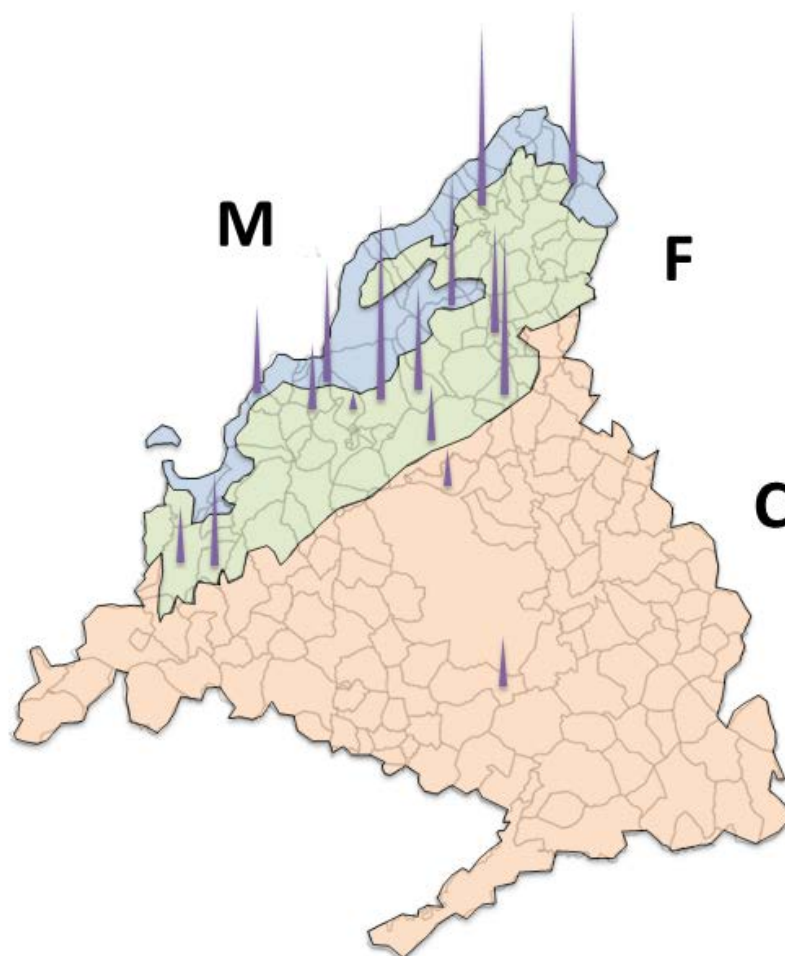


Imagen 16. Mapa con los municipios y su prevalencia de *B. bigemina*

Se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre *B. bigemina* y la variable **altitud** ( $p < 0,0001$ ). Los animales positivos a *B. bigemina* se encontraron a mayor altitud, con una media de  $1.037,4 \pm 140,8$  metros, frente a los animales sin amplificación de ADN de este agente, con una altitud media de  $907,7 \pm 228,3$  metros.

○ Momento de recogida de las muestras

El **mes de recogida** de las muestras estaba asociado estadísticamente con la amplificación de ADN de *B. bigemina* ( $p < 0,0001$ , **Tabla 59**). El mes de abril presentó mayor prevalencia (46,15%), mientras que en el mes de agosto no hubo ninguna muestra con amplificación de ADN del agente.



		PCR <i>B. bigemina</i>		
		Positivo	Negativo	Total
Mes de Recogida	Abril	Frecuencia	24	28
		Porcentaje	46,15	53,85
	Mayo	Frecuencia	28	155
		Porcentaje	15,3	84,7
	Junio	Frecuencia	9	30
		Porcentaje	23,08	76,92
	Agosto	Frecuencia	0	7
		Porcentaje	0	100
	Septiembre	Frecuencia	4	54
		Porcentaje	6,9	93,1
	Octubre	Frecuencia	44	113
		Porcentaje	28,03	71,97
	<b>Total</b>	Frecuencia	109	387
		Porcentaje	21,98	78,02

Tabla 59. Relación entre la amplificación de *B. bigemina* y el mes de la toma de muestras

La **estación del año** no estaba asociada estadísticamente con *B. bigemina* ( $p=0,058$ ). En primavera y otoño la prevalencia de fue del 22,26% (61/274) y 23,65% (48/203), respectivamente, mientras que en verano no hubo amplificación del agente (0/19).

Se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre *B. bigemina* y las variables **temperatura** y **humedad relativa** en el momento de la toma de muestras ( $p<0,0001$ , ambas). Los animales positivos a *B. bigemina* se encontraron a una temperatura media inferior ( $14,58 \pm 3,73^{\circ}\text{C}$ ) que los animales negativos, para los que se registró una temperatura media de  $16,40 \pm 4,22^{\circ}\text{C}$ . En cuanto a la humedad relativa registrada, la media fue de  $58,97 \pm 13,25\%$  en los animales con amplificación de ADN *B. bigemina*, mientras que en los animales sin amplificación fue de  $51,95 \pm 14,84\%$ .

○ Características del sistema productivo de las granjas estudiadas

Se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre la amplificación de ADN del agente y la **densidad** ( $p=0,0012$ ). Los animales positivos a *B. bigemina* presentaron una densidad media de  $0,64 \pm 0,57$  animales/ha, inferior a la densidad media que se encontró en los animales negativos,  $0,87 \pm 0,58$  animales/ha.

No se encontraron diferencias en la amplificación de este agente entre los animales procedentes de granjas donde se **introducían animales** (21,34%, 67/314) y los animales de granjas donde no se introducían animales (21,43%, 33/154) ( $p=0,98$ ).

**Compartir pastos** con otros rebaños fue un factor de riesgo que se asoció estadísticamente con la amplificación de este agente ( $p<0,0001$ , OR=3,0, IC al 95% de 1,95 a 4,88). Como se observa en la **tabla 60**, la prevalencia de *B. bigemina* fue mayor en los casos en los que los animales compartían pastos con otras ganaderías (35,71%) que cuando los animales no lo hacían (15,24%).

			PCR <i>B. bigemina</i>		
			Positivo	Negativo	Total
Pastos	Compartidos	Frecuencia	50	90	140
		Porcentaje	35,71	64,29	100
	No compartidos	Frecuencia	50	278	328
		Porcentaje	15,24	84,76	100
	Total	Frecuencia	100	368	468
		Porcentaje	21,37	78,63	100

Tabla 60. Relación entre la amplificación de *B. bigemina* y los pastos

○ Presencia de garrapatas en el momento de la toma de muestras y tratamientos antiparasitarios empleados

Se encontró asociación entre la **presencia de garrapatas** en el momento del muestreo y la amplificación de este agente ( $p=0,0008$ , OR=2,07, IC al 95% de 1,34 a 3,21). Los animales de las granjas con presencia de garrapatas en el momento de la toma de muestras tuvieron más riesgo de presentar el agente (30,72%), que los animales de granjas que no presentaron garrapatas durante la toma de muestras (17,58%) (**Tabla 61**).

			PCR <i>B. bigemina</i>		
			Positivo	Negativo	Total
Presencia de Garrapatas	Sí	Frecuencia	51	115	166
		Porcentaje	30,72	69,28	100
	No	Frecuencia	58	272	330
		Porcentaje	17,58	82,42	100
	Total	Frecuencia	109	387	496
		Porcentaje	21,98	82,69	100

Tabla 61. Relación entre la amplificación de *B. bigemina* y la presencia de garrapatas

Con respecto a los **tratamientos antiparasitarios**, hubo asociación entre desparasitar a los animales y la amplificación de ADN de *B. bigemina* en las muestras sanguíneas obtenidas ( $p < 0,0001$ , OR=0,74, IC al 95% de 0,70 a 0,79). En la **tabla 62** se observa que los animales de granjas donde se desparasitaba presentaron mayor riesgo de infección de *B. bigemina* (25,17%) que aquellos donde no se desparasitaba (0%).

			PCR <i>B. bigemina</i>		
			Positivo	Negativo	Total
Desparasitar	Sí	Frecuencia	109	324	433
		Porcentaje	25,17	74,83	100
	No	Frecuencia	0	60	60
		Porcentaje	0	100	100
	Total	Frecuencia	109	384	493
		Porcentaje	22,11	77,89	100

Tabla 62. Relación entre la amplificación de *B. bigemina* y el evento desparasitar

El **número de desparasitaciones al año**, analizada como variable categórica y cuantitativa, fue estadísticamente significativa con la presencia de *B. bigemina* ( $p < 0,0001$ , en ambos). Como se observa en la **Tabla 63** y **Gráfico 13**, hubo una prevalencia mayor cuando se desparasita dos veces al año (28,24%) y menor cuando se realiza una vez al año (19,26%). El análisis de estos datos como variable cuantitativa, determinó que los animales con amplificación de ADN de *B. bigemina* fueron desparasitados un mayor número de veces al año ( $1,92 \pm 0,75$  desparasitaciones al año), que los animales que no presentaron amplificación ( $1,54 \pm 0,99$  desparasitaciones al año).

			PCR <i>B. bigemina</i>		
			Positivo	Negativo	Total
Número de desparasitaciones al año	Ninguna	Frecuencia	0	60	60
		Porcentaje	0	100	100
	1 vez al año	Frecuencia	26	109	135
		Porcentaje	19,26	80,74	100
	2 veces al año	Frecuencia	74	188	262
		Porcentaje	28,24	71,76	100
	Más de 2 veces al año	Frecuencia	9	27	36
		Porcentaje	25	75	100
Total	Frecuencia	109	384	493	
	Porcentaje	22,11	77,89	100	

Tabla 63. Relación entre la amplificación de *B. bigemina* y número de desparasitaciones al año

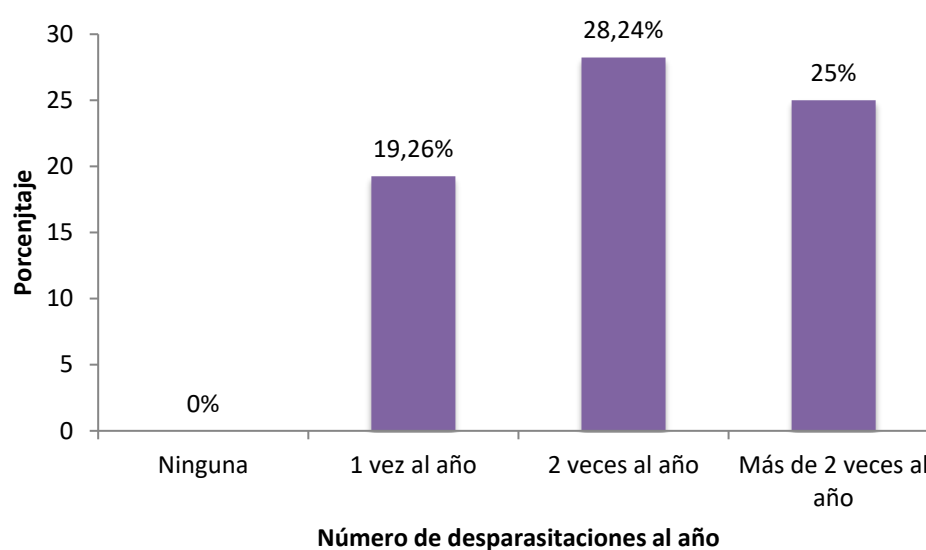


Gráfico 13. Porcentaje de animales positivos a *B. bigemina* en función del número de desparasitaciones al año

No se encontraron diferencias entre los **tratamientos antiparasitarios** empleados con la amplificación de ADN del agente ( $p=0,02$ ). Sin embargo, llama la atención, tal y como puede observarse en la **Tabla 64** y **Gráfico 14**, la menor prevalencia de *B. bigemina* cuando se usaron los piretroides solos (13,16%).

		PCR <i>B. bigemina</i>			
		Positivo	Negativo	Total	
Fármaco empleado	Ninguno	Frecuencia	0	60	60
		Porcentaje	0	100	100
	Piretroides	Frecuencia	5	33	38
		Porcentaje	13,16	86,84	100
	Lactonas macrocíclicas	Frecuencia	60	166	226
		Porcentaje	26,55	73,45	100

Piretroides y L. Macrocíclicas	Frecuencia	36	77	113
	Porcentaje	31,86	68,14	100
Piretroides, L. Macrocíclicas y Organofosforados	Frecuencia	8	23	31
	Porcentaje	25,81	74,19	100
<b>Total</b>	Frecuencia	109	359	468
	Porcentaje	23,29	76,71	100

Tabla 64. Relación entre la amplificación de *B. bigemina* y el fármaco empleado como antiparasitario

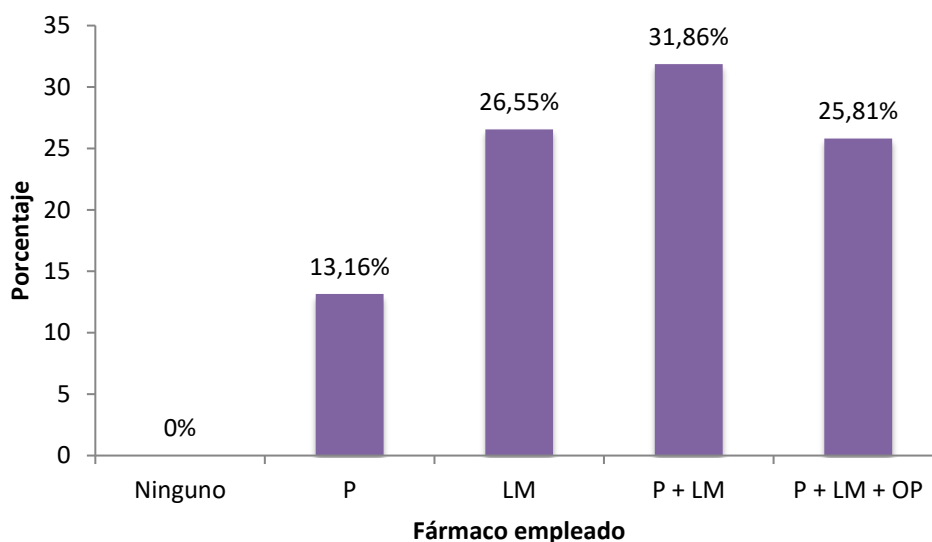


Gráfico 14. Porcentaje de animales positivos a *B. bigemina* en relación con el fármaco utilizado (P, piretroides; LM, lactonas macrocíclicas y OP, organofosforados)

#### ○ Historial de enfermedades transmitidas por garrapatas

No se encontró asociación estadística entre la descripción de **casos clínicos previos de enfermedades transmitidas por garrapatas** en las granjas de procedencia de los animales muestreados y la amplificación de ADN de *B. bigemina* ( $p=0,18$ ). La prevalencia fue del 25,37% (34/134) en las granjas con historial de enfermedades transmitidas por garrapatas y del 19,76% (66/334) en las granjas sin casos previos.

#### ○ Contacto con animales de otras especies

##### ▪ *Contacto con otros animales domésticos*

Con respecto al contacto con otros **animales domésticos**, se encontró asociación entre la amplificación de ADN de *B. bigemina* y la presencia de estos

animales en la granja ( $p < 0,0001$ ,  $OR = 0,34$ , IC al 95% de 0,21 a 0,54). La presencia de animales domésticos, concretamente caballos y perros, fue un factor de protección frente a la infección de *B. bigemina*, con menor prevalencia en el vacuno si existía contacto con estas otras especies domésticas (12,81%) en comparación con la ausencia de estos animales en la granja de origen (30,13%), tal y como se puede observar en la **Tabla 65**.

			<b>PCR <i>B. bigemina</i></b>		
			Positivo	Negativo	Total
<b>Animales Domésticos</b>	Sí	Frecuencia	31	211	242
		Porcentaje	12,81	87,19	100
	No	Frecuencia	69	160	229
		Porcentaje	30,13	69,87	100
	<b>Total</b>	Frecuencia	100	371	471
		Porcentaje	21,23	78,77	100

Tabla 65. Relación entre la amplificación de *B. bigemina* y la presencia de animales domésticos

▪ *Contacto con fauna silvestre*

Se encontró asociación estadísticamente significativa entre el agente estudiado y la presencia de **carnívoros silvestres**, **rumiantes silvestres** y **aves rapaces** (**Tabla 66**). La presencia de **carnívoros silvestres** (concretamente se registró la presencia de zorro, tejón y lobo) fue un factor de protección para la infección por *B. bigemina* ( $p = 0,0062$ ,  $OR = 0,54$ , IC al 95% de 0,35 a 0,84). Las **aves rapaces** también fueron un factor de protección. El 16,8% de los animales presentaron amplificación de ADN del agente cuando se registró la presencia de aves rapaces, y el 26,98% cuando no se registró ( $p = 0,0494$ ,  $OR = 0,65$ , IC al 95% de 0,42 a 1,00). Sin embargo, en presencia de **rumiantes silvestres** (cabras montesas, corzos, gamos y/o ciervos), las vacas tuvieron una prevalencia mayor (31,02%) que en su ausencia (7,77%) ( $p < 0,0001$ ,  $OR = 5,33$ , IC al 95% 2,98 a 9,53).

<b>Resultados de la PCR de <i>B. bigemina</i></b>				
<b>Presencia de:</b>		Número de animales positivos (porcentaje)	Número de animales negativos (porcentaje)	Número total de animales (porcentaje)
<b>Jabalíes</b>	Sí	96 (23,19%)	318 (76,81%)	414 (83,47%)
	No	13 (15,85%)	69 (84,15%)	82 (16,53%)
<b>Carnívoros silvestres</b>	Sí	41 (16,8%)	203 (83,2%)	244 (49,19%)
	No	68 (26,98%)	184 (73,0%)	252 (50,81%)
<b>Conejos y liebres</b>	Sí	98 (22,74%)	333 (77,26%)	431 (86,9%)
	No	11 (16,92%)	54 (83,08%)	65 (13,1%)

<b>Rumiantes silvestres</b>	Sí	94 (31,02%)	209 (68,98%)	303 (61%)
	No	15 (7,77%)	178 (92,23%)	193 (39%)
<b>Aves rapaces</b>	Sí	45 (18,29%)	201 (81,71%)	246 (49,6%)
	No	64 (25,6%)	186 (74,4%)	250 (50,4%)

Tabla 66. Relación entre la amplificación de *B. bigemina* y la presencia de animales silvestres

No se encontraron asociaciones estadísticas entre la amplificación de este agente y la **presencia de jabalíes** ( $p=0,1428$ ) ni con la presencia de **conejos y liebres** ( $p=0,29$ ).

#### 5.3.4.3. Relación entre la positividad a *B. bigemina* y los resultados de la hematología y de la bioquímica sanguínea de los animales incluidos en el estudio

En la siguiente tabla se observan los **valores analíticos** de los animales con amplificación y sin amplificación del agente estudiado (Tabla 67).

Resultados de la PCR de <i>B. bigemina</i>							
Parámetros Hematológicos	Animales positivos			Animales negativos			p
	Media $\pm$ DE	Mínimo	Máximo	Media $\pm$ DE	Mínimo	Máximo	
Glóbulos rojos ( $10^6/\mu\text{l}$ )	7,42 $\pm$ 1,39	5,01	11,44	7,00 $\pm$ 1,32	4,33	13,74	<b>0,01</b>
Hemoglobina (g/dl)	12,40 $\pm$ 1,39	8,20	16,10	12,31 $\pm$ 1,67	8,10	17,90	0,65
Hematocrito (%)	31,88 $\pm$ 3,76	21,70	41,60	31,71 $\pm$ 4,59	21,30	46,70	0,74
VCM (fl)	43,64 $\pm$ 5,16	27,90	54,00	45,83 $\pm$ 4,92	30,10	60,50	<b>0,0008</b>
HCM (pg)	17,01 $\pm$ 2,07	11,30	20,80	17,83 $\pm$ 1,95	11,80	23,70	<b>0,0016</b>
CHCM (g/dl)	38,94 $\pm$ 1,08	36,20	41,10	38,91 $\pm$ 0,99	35,80	43,50	0,82
Leucocitos ( $10^3/\mu\text{l}$ )	10,85 $\pm$ 3,15	5,40	20,18	8,65 $\pm$ 2,35	2,99	15,03	<b>&lt;0,0001</b>
Neutrófilos ( $10^3/\mu\text{l}$ )	2,64 $\pm$ 1,13	0,50	6,10	2,43 $\pm$ 1,17	0,30	8,90	0,15
Linfocitos ( $10^3/\mu\text{l}$ )	6,69 $\pm$ 2,61	1,60	13,10	4,88 $\pm$ 1,84	0,60	11,10	<b>&lt;0,0001</b>
Monocitos ( $10^3/\mu\text{l}$ )	0,45 $\pm$ 0,29	0,00	1,80	0,39 $\pm$ 0,20	0,10	1,50	0,1
Eosinófilos ( $10^3/\mu\text{l}$ )	0,92 $\pm$ 0,58	0,20	2,80	0,83 $\pm$ 0,49	0,10	2,90	0,25
Basófilos ( $10^3/\mu\text{l}$ )	0,09 $\pm$ 0,05	0,00	0,30	0,06 $\pm$ 0,05	0,00	0,50	<b>0,0028</b>

Plaquetas (10 <sup>3</sup> /μl)	251,2 ± 146,5	35,00	923,00	248,9 ± 129,7	28,00	1203,00	0,89
AST (U/l)	99,92 ± 26,29	63,00	218,00	115,6 ± 160,5	52,00	1805,00	0,12
ALT (U/l)	38,84 ± 14,12	12,00	79,00	41,22 ± 33,77	8,00	394,00	0,36
Proteínas Totales (g/dl)	7,44 ± 0,81	5,70	10,40	7,53 ± 0,71	5,70	9,50	0,34

Tabla 67. Relación entre la amplificación de *B. bigemina* y los parámetros hematológicos y bioquímicos sanguíneos (DE, desviación estándar. Se resaltan en negrita los valores de p inferiores a 0,05)

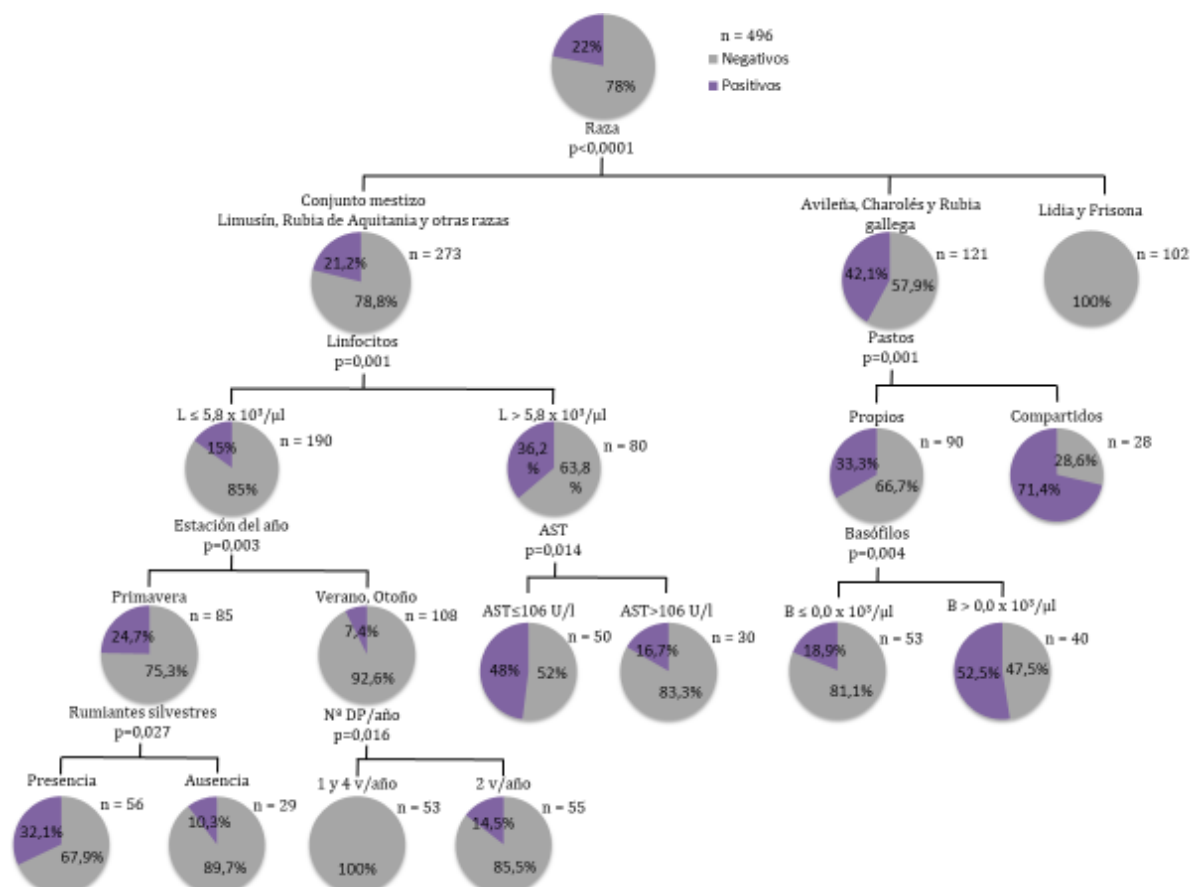
En este caso se pudo realizar analítica sanguínea a 75 animales de los 109 positivos a la PCR de *B. bigemina* y de 277 de los 387 negativos. Todos los valores medios de los parámetros del estudio hematológico y de la concentración de proteínas totales se encontraron dentro de los rangos de referencia para la especie tanto en los animales positivos a la PCR frente a *B. bigemina* como en los negativos. Sin embargo, el estudio estadístico de estos datos ha mostrado que los bovinos a partir de cuyas muestras sanguíneas fue posible amplificar ADN de *B. bigemina* presentan un mayor recuento de eritrocitos ( $p=0,01$ ) y menores valores de VCM y HCM ( $p=0,0008$  y  $p=0,0016$ , respectivamente). En relación a la serie blanca, estos animales presentaron mayores recuentos de leucocitos totales ( $p<0,0001$ ) y de linfocitos y basófilos ( $p<0,0001$  y  $p=0,0028$ , respectivamente). En este sentido, un total de 23 animales de los 75 con analítica sanguínea y amplificación de ADN de *B. bigemina* presentaron leucocitosis (de 12,43 a 20,18 x 10<sup>3</sup> leucocitos/μl, rango 4-12 x 10<sup>3</sup> leucocitos/μl) con linfocitosis (de 6,4 a 13,1 x 10<sup>3</sup> linfocitos/μl, rango 2,5-7,5 x 10<sup>3</sup> linfocitos/μl).

En el caso de las enzimas hepáticas, cabe destacar que el valor medio de la ALT se encontró ligeramente por encima del límite superior para la especie en los animales tanto positivos como negativos a *B. bigemina* (rango de 17 a 37 U/I), mientras que el valor medio de la AST estuvo ligeramente por encima del rango de referencia en el caso de los bovinos negativos a este agente (rango de 48 a 100 U/I).

#### 5.3.4.4. Árbol de decisión de *B. bigemina*

En este caso, la mayor prevalencia es el 71,4% de avileña, charoles y rubia gallega con pastos compartidos (**Imagen 17**).



Imagen 17. Árbol de decisión de *B. bigemina*

### 5.3.5. RESULTADOS DE LA PCR DE *Babesia divergens* EN LOS ANIMALES DE ESTUDIO

#### 5.3.5.1. Prevalencia en la Comunidad de Madrid

En la PCR empleada para la detección de *Babesia divergens*, hubo amplificación de ADN de este agente en 11 animales de los 496 analizados, lo que supone una prevalencia del  $2,22 \pm 1,37\%$  (IC al 95% de 0,9 a 3,5%). Estos animales pertenecían a cinco granjas de las 34 muestreadas, lo que indica que este agente estaba presente en el 14,7% de las granjas que fueron incluidas en el estudio, con una prevalencia media de 2,36%, un mínimo de 8% y un máximo de 25%.

*B. divergens* es el agente que menos se detectó como agente único, causando infección simple en tan solo dos individuos, lo que representa el 0,4% del total.

### 5.3.5.2. Relación entre la positividad a *B. divergens* y los datos epidemiológicos recogidos

#### ○ Relación de la prevalencia con los datos de la reseña de los animales

La **raza** no estaba asociada estadísticamente con la amplificación de ADN de *B. divergens* ( $p=0,0659$ ). Fueron positivos a esta PCR siete animales de los 189 pertenecientes a las razas conjunto mestizo (3,7%), dos animales de la raza rubia gallega (2/24, 8,33%) y otros dos animales de la categoría de otras razas (2/25, 8%), concretamente, un animal de raza parda de la montaña y otro de raza asturiana de la montaña.

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas para la prevalencia de *B. divergens* en función del **sexo** ( $p=0,47$ ). Las hembras presentaron una prevalencia del 2,14% (10/469) y los machos del 3,57% (1/28).

Tampoco se encontraron asociaciones con la **edad**, ni como variable categórica ni como variable numérica ( $p=0,27$  y  $p=0,09$ , respectivamente). El grupo de edad con mayor prevalencia fue el de los terneros, aunque con un único animal positivo de los 15 muestreados (6,67%), mientras que los animales mayores de ocho años presentaron la menor prevalencia (1/111, 0,9%), tal y como puede observarse en el **Gráfico 15**. Aunque de forma no estadísticamente significativa, la media de edad de los animales positivos fue menor ( $3,56 \pm 2,58$  años, 0,99-10,13 años) que la de los animales negativos ( $5,57 \pm 3,91$  años, 0,35-18,33 años).

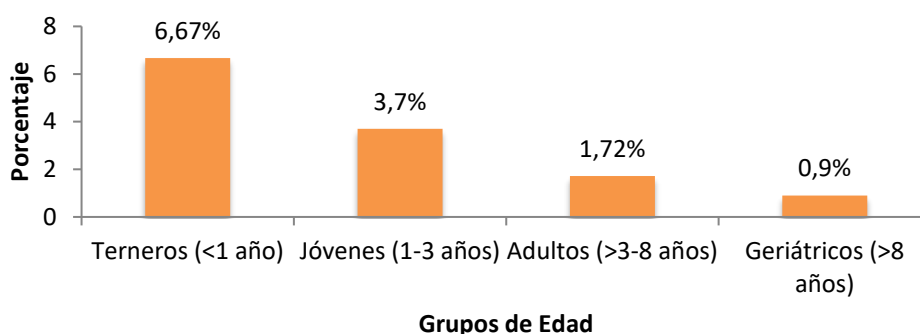


Gráfico 15. Porcentaje de animales positivos a *B. divergens* en los diferentes grupos de edad

○ Distribución geográfica de las granjas muestreadas

En la **tabla 68** se detalla la distribución de los animales en función de la granja, municipio y zona a la que pertenecían.

Zona	Municipio	Número de animales positivos en relación al número de animales muestreados (porcentaje)	Nº de Granja	Número de animales positivos en relación al número de animales muestreados (porcentaje)	Número total de animales positivos en relación al número total de animales muestreados (porcentaje)
<b>M</b>	Bustarviejo	0/21 (0%)	<b>20</b>	0/21 (0%)	8/89 (8,99%)
	Cercedilla	1/14 (7,14%)	<b>4</b>	0/3 (0%)	
			<b>27</b>	1/11 (9,09%)	
	Los Molinos	0/16 (0%)	<b>24</b>	0/6 (0%)	
			<b>25</b>	0/10 (0%)	
	Prádena del Rincón	6/25 (24%)	<b>28</b>	6/25 (24%)	
<b>F</b>	Robledo de Chavela	0/6 (0%)*	<b>1</b>	0/6 (0%)	3/293 (1,02%)
	Somosierra	1/7 (14,29%)	<b>22</b>	1/7 (14,29%)	
	Becerril de la Sierra	0/11 (0%)	<b>6</b>	0/5 (0%)	
			<b>12</b>	0/6 (0%)	
	Cabanillas de la Sierra	0/30 (0%)	<b>29</b>	0/30 (0%)	
	Collado Villalba	0/21 (0%)	<b>17</b>	0/15 (0%)	
			<b>23</b>	0/6 (0%)	
	Colmenar Viejo	0/25 (0%)	<b>30</b>	0/25 (0%)	
	El Boalo	0/19 (0%)	<b>11</b>	0/5 (0%)	
			<b>19</b>	0/14 (0%)	
	Fresnedillas de la Oliva	1/4 (25%)	<b>21</b>	1/4 (25%)	
	Gascones	2/45 (4,44%)	<b>13</b>	0/20 (0%)	
			<b>33</b>	2/25 (8%)	
	Guadarrama	0/10 (0%)	<b>8</b>	0/10 (0%)	
	Manzanares El Real	0/20 (0%)	<b>2</b>	0/20 (0%)	
	Mataelpino	0/3 (0%)	<b>3</b>	0/3 (0%)	
	Moralzarzal	0/2 (0%)	<b>7</b>	0/2 (0%)	
	Pedrezuela	0/20 (0%)	<b>5</b>	0/20 (0%)	
	Robledo de Chavela	0/31 (0%)*	<b>34</b>	0/17 (0%)	
			<b>35</b>	0/14 (0%)	
	Soto del Real	0/52 (0%)	<b>14</b>	0/31 (0%)	
			<b>31</b>	0/9 (0%)	

			<b>32</b>	0/12 (0%)	
<b>C</b>	Getafe	0/15 (0%)	<b>15</b>	0/15 (0%)	0/114 (0%)
	Navalagamella	0/25 (0%)	<b>26</b>	0/25 (0%)	
	Rivas-Vaciamadrid	0/50 (0%)	<b>18</b>	0/50 (0%)	
	Tres Cantos	0/10 (0%)	<b>10</b>	0/10 (0%)	
	Villamantilla	0/14 (0%)	<b>9</b>	0/14 (0%)	

Tabla 68. Prevalencia de *B. divergens* en los diferentes municipios y granjas muestreados

\*Dos de las tres granjas muestreadas del municipio de Robledo de Chavela pertenecen a la zona F y una a la zona M

La **granja** de procedencia de los animales muestreados se asoció estadísticamente con la amplificación de ADN del agente ( $p < 0,0001$ ). De las cinco granjas positivas (números 21, 22, 27, 28 y 33), dos presentaron valores de prevalencia por encima del 20%. El mayor número de bovinos positivos a *B. divergens* se encontró en la granja nº 28, localizada en el municipio de Prádena del Rincón, con seis animales positivos de los 25 muestreados (24%).

El **municipio** de procedencia de los animales se asoció estadísticamente con la amplificación de ADN de *B. divergens* ( $p < 0,0001$ ), habiéndose detectado animales positivos para este agente en los municipios de Fresnedillas de la Oliva, Somosierra, Cercedilla, Prádena del Rincón y Gascones (5/24, 20,8%) (**Tabla 68 e Imagen 18**).

El estudio de los datos mostró una asociación estadísticamente significativa entre la **zona** en la que se encontraba la granja de los animales muestreados y la amplificación de ADN de *B. divergens* ( $p < 0,0001$ , **Tabla 68**). La zona de montaña (M) presentó una mayor prevalencia (8,99%) en comparación con la zona fresca (F, 1,02% de prevalencia,  $p = 0,0006$ ) y la zona cálida (C, 0% de prevalencia,  $p = 0,0011$ ) que fue estadísticamente significativa.

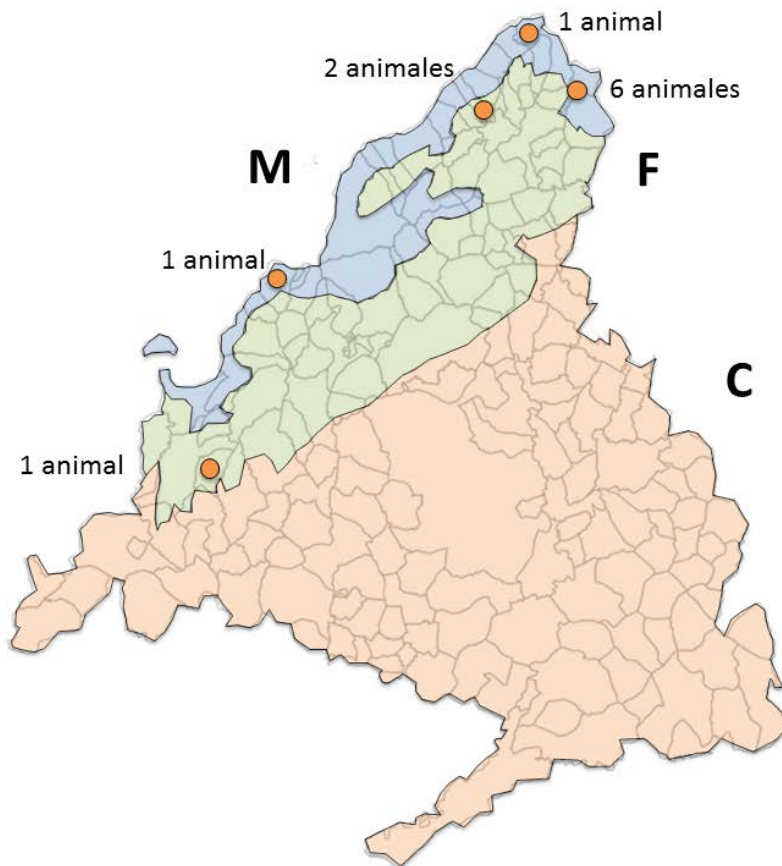


Imagen 18. Mapa con los animales positivos a *B. divergens* y sus municipios de procedencia

Se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre *B. divergens* y las variables **altitud** ( $p < 0,0001$ ). Los animales positivos a *B. divergens* se encontraban a una altitud media de  $1.187,5 \pm 119,7$  metros, mayor que la altitud a la que se encontraban los animales de cuya muestra sanguínea no se amplificó ADN de este agente ( $930,5 \pm 217,3$  metros).

- Momento de la recogida de las muestras

El **mes de recogida** de las muestras estuvo asociado estadísticamente con la amplificación de ADN de *B. divergens* ( $p = 0,0037$ , **Tabla 69**). Únicamente se detectó este agente en una muestra cada mes de las tomadas durante los meses de junio, agosto y septiembre, por lo que este dato debe ser considerado a la hora de interpretar los valores de prevalencia de *B. divergens* en función del mes de recogida.

		PCR <i>B. divergens</i>			
		Positivo	Negativo	Total	
Mes de Recogida	Abril	Frecuencia	0	52	52
		Porcentaje	0	100	100
	Mayo	Frecuencia	0	183	183
		Porcentaje	0	100	100
	Junio	Frecuencia	1	38	39
		Porcentaje	2,56	97,44	100
	Agosto	Frecuencia	1	6	7
		Porcentaje	14,29	85,71	100
	Septiembre	Frecuencia	1	57	58
		Porcentaje	1,72	98,28	100
	Octubre	Frecuencia	8	149	157
		Porcentaje	5,1	94,9	100
Total	Frecuencia	11	485	496	
	Porcentaje	2,22	97,78	100	

Tabla 69. Relación entre la amplificación de *B. divergens* y el mes de la toma de muestras

La **estación del año** en que se recogieron las muestras también estuvo asociada con la amplificación de ADN de *B. divergens* ( $p=0,0028$ , **Tabla 70**). Al igual que en el caso anterior, únicamente se amplificó ADN de este agente con la PCR empleada en este estudio en una muestra recogida durante la primavera y en una muestra recogida en verano, y, sin embargo, es esta última estación en la que se obtiene un mayor valor de prevalencia.

		PCR <i>B. divergens</i>		
		Positivo	Negativo	Total
Estación del Año	Otoño	Frecuencia	9	194
		Porcentaje	4,43	100
	Primavera	Frecuencia	1	273
		Porcentaje	0,36	100
	Verano	Frecuencia	1	18
		Porcentaje	5,26	100
	Total	Frecuencia	11	485
		Porcentaje	2,22	97,78

Tabla 70. Relación entre la amplificación de *B. divergens* y la estación del año

No se encontró asociación estadística entre la **temperatura** y la amplificación de ADN de *B. divergens* ( $p=0,4228$ ). Los animales positivos a *B. divergens*, se encontraban a una temperatura media en el momento de la toma de muestras de  $15 \pm 3,5^{\circ}\text{C}$  en el momento del muestreo, y para los animales sin este agente se registró una temperatura media de  $16 \pm 4,2^{\circ}\text{C}$ .

Se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre la amplificación de ADN de *B. divergens* y la variable **humedad relativa** ( $p=0,003$ ), habiéndose registrado mayores valores en las muestras que resultaron positivas a *B. divergens* ( $66,54 \pm 16,23\%$ ) que en las muestras negativas ( $53,20 \pm 14,63\%$ ).

○ Características del sistema productivo de las granjas estudiadas

La variable **densidad** de los animales se asoció estadísticamente con la detección de *B. divergens* ( $p<0,0001$ ). Los animales positivos a *B. divergens* se encontraban en granjas que presentaban una densidad media de  $0,27 \pm 0,2$  animales/ha, menor que la registrada en las granjas de los animales negativos, que fue de  $0,84 \pm 0,58$  animales/ha.

No se encontró asociación estadística entre la amplificación de ADN de este agente y la **introducción de animales** a la explotación ( $p=0,5$ ), con un valor de prevalencia de 2,55% (8/314) en las granjas en las que se introducían bovinos procedentes de otras explotaciones y de 1,3% (2/154) en las granjas con reposición a partir de los animales de la propia granja.

**Compartir pastos** con otros rebaños de ganado vacuno se asoció estadísticamente con la positividad frente a *B. divergens* ( $p=0,0014$ , OR=9,8, IC al 95% de 2,07 a 47,13). En la **Tabla 71** se puede observar que los animales que hacían uso de los pastos comunales tuvieron una prevalencia del 5,71%, mayor que la prevalencia encontrada en los animales que no compartían pastos (0,61%).

			PCR <i>B. divergens</i>		
			Positivo	Negativo	Total
Pastos	Compartidos	Frecuencia	8	132	140
		Porcentaje	5,71	94,29	100
	No compartidos	Frecuencia	2	326	328
		Porcentaje	0,61	99,39	100
	Total	Frecuencia	10	458	468
		Porcentaje	2,14	97,86	100

Tabla 71. Relación entre la amplificación de *B. divergens* y los pastos

○ Presencia de garrapatas en el momento de la toma de muestras y tratamientos antiparasitarios empleados

Se encontró asociación entre la **presencia de garrapatas** en el momento del muestreo y la amplificación de este agente ( $p=0,0013$ , OR=9,40, IC al 95% de 2,00 a

44,02), pudiendo considerarse un factor de riesgo para la infección por *B. divergens* en las vacas del estudio. Los animales procedentes de granjas en las que se registraron garrapatas durante la toma de muestras sanguíneas tuvieron una prevalencia del 5,42%, a diferencia del 0,61% en animales muestreados de granjas donde no se observaron (Tabla 72).

			PCR <i>B. divergens</i>		
			Positivo	Negativo	Total
Presencia de Garrapatas	Sí	Frecuencia	9	157	166
		Porcentaje	5,42	94,58	100
	No	Frecuencia	2	328	330
		Porcentaje	0,61	99,39	100
	Total	Frecuencia	11	485	496
		Porcentaje	2,22	103,63	100

Tabla 72. Relación entre la amplificación de *B. divergens* y la presencia de garrapatas

El hecho de que en las granjas se **desparasitase** o no a los animales no se asoció estadísticamente con la amplificación de ADN en las muestras sanguíneas ( $p=0,37$ ), si bien los animales que eran desparasitados presentaron una prevalencia del 2,54% (11/433) y los que no, una prevalencia del 0% (0/60).

El análisis del **número de desparasitaciones al año** como variable categórica no se asoció estadísticamente con la detección del agente ( $p=0,08$ ). Diez de los animales positivos a este agente eran desparasitados dos veces al año y uno se encontraba en una granja en la que se desparasitaba una vez al año. Sin embargo, cuando se analizó la variable **número de desparasitaciones al año** desde el punto de vista cuantitativo, se encontraron diferencias significativas ( $p=0,0123$ ). Se determinó que los animales con amplificación de ADN de *B. divergens* presentaron de media  $1,9 \pm 0,3$  desparasitaciones al año, mientras que en los animales que no presentaron amplificación fue de  $1,62 \pm 0,96$  desparasitaciones/año.

El **fármaco empleado** para la desparasitación no presentó asociación con la amplificación de ADN de *B. divergens* ( $p=0,36$ ). Los animales desparasitados con lactonas macrocíclicas y su combinación con piretroides presentaron una prevalencia del 3,1% (7/226) y del 3,54% (4/113), respectivamente, mientras que los animales desparasitados con piretroides (0/38) y la combinación de los tres fármacos (0/31) presentaron una prevalencia del 0% en ambos casos.



- Historial de enfermedades transmitidas por garrapatas

No se encontró asociación estadística entre la existencia de historial de **casos** clínicos previos de enfermedades de transmisión vectorial en la granja y la amplificación de ADN de *B. divergens* ( $p=0,06$ ). No se amplificó ADN del agente en ningún animal perteneciente a las explotaciones donde se habían registrado previamente casos clínicos caracterizados por la presencia de signos tales como palidez de mucosas, anorexia, ictericia, hematuria o hemoglobinuria, fiebre, bajada de la producción de leche o abortos en hembras gestantes (0/134), mientras que la prevalencia en las granjas donde no hubo casos previos fue del 2,99% (10/334).

- Contacto con animales de otras especies

- *Contacto con otros animales domésticos*

Con respecto a la variable contacto con otros **animales domésticos**, no se encontró asociación con la amplificación de ADN del agente estudiado ( $p=0,1$ ). Los animales muestreados con exposición a otros animales domésticos presentaron una prevalencia del 3,31% (8/242) y ésta fue del 0,87% (2/229) en los animales sin exposición.

- *Contacto con fauna silvestre*

La presencia de **carnívoros silvestres**, concretamente zorro, tejón y lobo, presentó asociación estadísticamente significativa con el agente amplificado ( $p=0,0286$ , OR=4,78 IC al 95% de 1,02 a 22,38), siendo un factor de riesgo para la infección por *B. divergens*, como se muestra en la **Tabla 73**.

La presencia de **rumiantes silvestres** (corzos, gamos, ciervos y cabras montesas) en las zonas de muestreo se asoció estadísticamente con el agente estudiado, siendo un factor de riesgo ( $p=0,0085$ , OR=0,96, IC al 95% de 0,94 a 0,98,). En la **Tabla 73** se muestra una prevalencia del 3,36% en presencia de los rumiantes silvestres frente al 0% cuando no se registró su presencia.

La presencia de **aves rapaces** en las granjas del estudio se asoció estadísticamente con la amplificación de *B. divergens* ( $p=0,0307$ , OR=4,70, IC al 95% de 1,00 a 22,01). Nueve de los 244 animales muestreados procedentes de granjas con aves rapaces presentaron amplificación de ADN del agente, siendo dos los positivos en el grupo de 250 animales procedentes de granjas en las que no existían estas aves (**Tabla 73**).

Resultados de la PCR de <i>B. divergens</i>				
Presencia de:		Número de animales positivos (porcentaje)	Número de animales negativos (porcentaje)	Número total de animales (porcentaje)
<b>Jabalíes</b>	Sí	11 (2,66%)	403 (97,34%)	414 (83,47%)
	No	0 (0%)	82 (100%)	82 (16,53%)
<b>Carnívoros silvestres</b>	Sí	9 (3,69%)	235 (96,31%)	244 (49,19%)
	No	2 (0,79%)	250 (99,21%)	252 (50,81%)
<b>Conejos y liebres</b>	Sí	9 (2,09%)	422 (97,91%)	431 (86,9%)
	No	2 (3,08%)	63 (96,92%)	65 (13,1%)
<b>Rumiantes silvestres</b>	Sí	11 (3,63%)	292 (96,37%)	303 (61%)
	No	0 (0%)	193 (100%)	193 (39%)
<b>Aves rapaces</b>	Sí	9 (3,66%)	237 (96,34%)	246 (49,6%)
	No	2 (0,8%)	248 (99,2%)	250 (50,4%)

Tabla 73. Relación entre la amplificación de *B. divergens* y la presencia de animales silvestres

No se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre la amplificación de este agente y la **presencia de jabalíes** ( $p=0,2249$ ), a pesar de que todos los animales positivos se encontraron en zonas con este ungulado (2,66%, 11/414). Tampoco se asoció el agente con la presencia de **conejos y liebres** ( $p=0,64$ ): nueve animales de los que presentaron amplificación se encontraron en zonas donde se había registrado conejos y/o liebres (2,09%, 9/431) y dos animales en zonas donde no se registraron estos animales silvestres (3,08%, 2/65).

#### 5.3.5.3. Relación entre la positividad a *B. divergens* y los resultados de la hematología y de la bioquímica sanguínea de los animales incluidos en el estudio

En la siguiente tabla se observan los **valores analíticos** de los animales con amplificación y sin amplificación de ADN del agente estudiado (Tabla 74).

Resultados de la PCR de <i>B. divergens</i>							
Parámetros Hematológicos	Animales positivos			Animales negativos			p
	Media $\pm$ DE	Mínimo	Máximo	Media $\pm$ DE	Mínimo	Máximo	
Glóbulos rojos ( $10^6/\mu\text{l}$ )	6,97 $\pm$ 0,84	5,76	8,06	7,09 $\pm$ 1,35	4,33	13,74	0,79
Hemoglobina (g/dl)	12,70 $\pm$ 1,87	10,30	16,10	12,32 $\pm$ 1,61	8,10	17,90	0,51

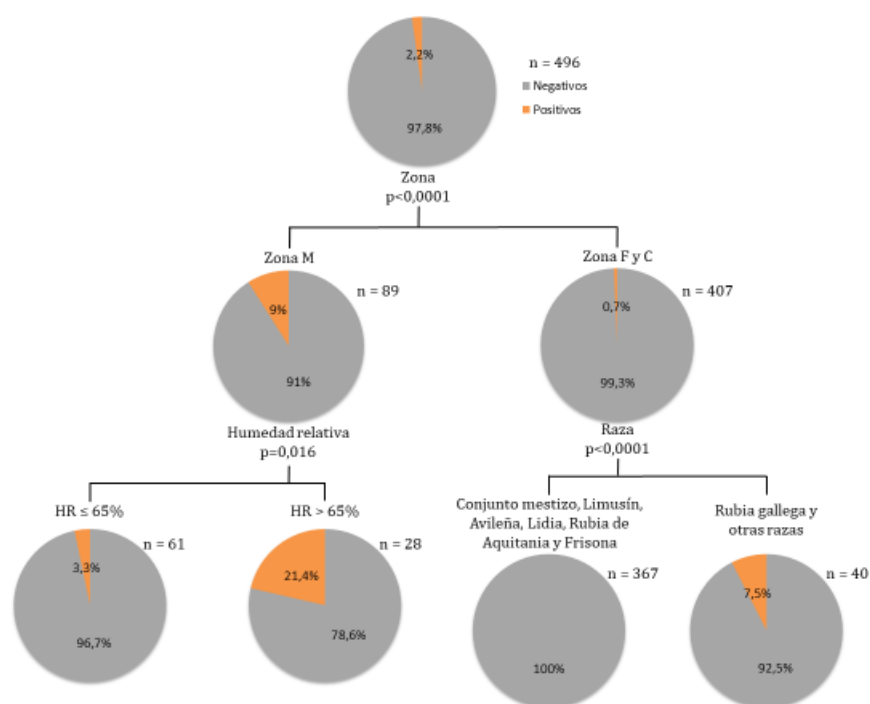
Hematocrito (%)	32,18 ± 4,37	26,00	39,90	31,74 ± 4,43	21,30	46,70	0,78
VCM (fl)	46,16 ± 3,08	39,70	49,70	45,34 ± 5,08	27,90	60,50	0,65
HCM (pg)	18,18 ± 1,17	16,10	20,10	17,64 ± 2,02	11,30	23,70	0,45
CHCM (g/dl)	39,41 ± 1,09	37,50	40,60	38,90 ± 1,01	35,80	43,50	0,16
Leucocitos (10 <sup>3</sup> /μl)	11,40 ± 3,27	7,13	16,66	9,07 ± 2,66	2,99	20,18	<b>0,01</b>
Neutrófilos (10 <sup>3</sup> /μl)	2,61 ± 1,03	1,50	4,80	2,47 ± 1,17	0,30	8,90	0,73
Linfocitos (10 <sup>3</sup> /μl)	7,27 ± 2,64	3,10	10,60	5,22 ± 2,13	0,60	13,10	<b>0,007</b>
Monocitos (10 <sup>3</sup> /μl)	0,35 ± 0,13	0,20	0,50	0,41 ± 0,22	0,00	1,80	0,44
Eosinófilos (10 <sup>3</sup> /μl)	1,07 ± 0,43	0,40	1,60	0,85 ± 0,51	0,10	2,90	0,22
Basófilos (10 <sup>3</sup> /μl)	0,08 ± 0,03	0,00	0,10	0,07 ± 0,05	0,00	0,50	0,47
Plaquetas (10 <sup>3</sup> /μl)	227,0 ± 94,96	40,00	316,00	249,9 ± 134,1	28,00	1203,00	0,63
AST (U/l)	92,87 ± 16,33	72,00	120,00	112,7 ± 144,6	52,00	1805,00	<b>0,04</b>
ALT (U/l)	48,50 ± 14,90	30,00	79,00	40,53 ± 30,92	8,00	394,00	0,18
Proteínas Totales (g/dl)	7,15 ± 0,53	6,00	7,70	7,52 ± 0,74	5,70	10,40	0,15

Tabla 74. Relación entre la amplificación de *B. divergens* y los parámetros hematológicos y de la bioquímica sanguínea (DE, desviación estándar. Se resaltan en negrita los valores de p inferiores a 0,05)

Los recuentos de leucocitos y linfocitos estuvieron asociados de forma estadísticamente significativa con la detección de *B. divergens* ( $p=0,01$  y  $0,007$ , respectivamente), encontrándose los valores medios por encima de los de los animales negativos. Concretamente, tres de los ocho bovinos en los que se detectó esta babesia de los que fue posible realizar analítica sanguínea presentaron leucocitosis por linfocitosis. También se encontró asociación estadísticamente significativa entre los valores de AST y la amplificación de *B. divergens* ( $p=0,04$ ). En este caso los animales con amplificación de ADN de este agente presentaron valores menores ( $92,87 \pm 16,33$  U/l) que los animales negativos ( $112,7 \pm 144,60$  U/l) (rango de 48 a 100 U/l).

#### 5.3.5.4. Árbol de decisión de *B. divergens*

El mayor porcentaje de animales positivos (21,4%) se encuentra en zonas de montaña con una humedad relativa por encima del 65% (**Imagen 19**).

Imagen 19. Árbol de decisión de *B. bigemina*

### **5.3.6. RESULTADOS DE LA PCR DE *Theileria annulata* EN LOS ANIMALES DE ESTUDIO**

#### **5.3.6.1. Prevalencia en la Comunidad de Madrid**

La PCR de *Theileria annulata* permitió amplificar ADN de este agente en 111 de los 496 animales muestreados ( $22,38 \pm 3,72\%$ , IC al 95% de 18,7 a 26%), que se encontraron en 18 de las 34 granjas (lo que representa el 52,94% de las granjas muestreadas) con una prevalencia media de 26,56%, un mínimo de 6,67% y un máximo de 100%.

Se detectó amplificación de ADN de *T. annulata* como único agente en 56 animales, lo que supone el 11,3%.

#### **5.3.6.2. Relación entre la positividad a *T. annulata* y los datos epidemiológicos recogidos**

- Relación de la prevalencia con los datos de la reseña de los animales

Se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre la **raza** y la amplificación de ADN de *T. annulata* ( $p<0,0001$ , **Tabla 75**). Entre las razas en las que

se detectó este agente, la raza conjunto mestizo presentó la mayor prevalencia (46,03%, 87/189) y la frisona fue la raza con menor prevalencia (1,32%, 1/76). Los animales de las razas rubia de Aquitania y rubia gallega no presentaron amplificación de ADN de este agente.

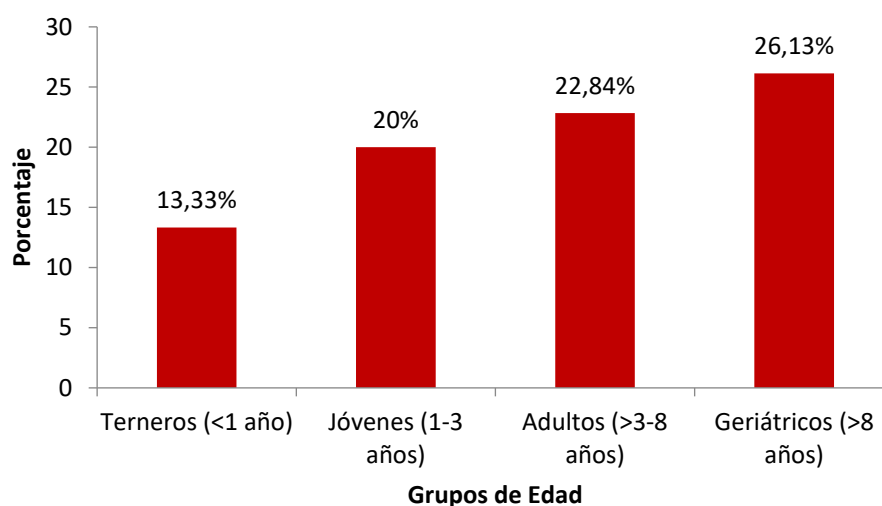
		PCR <i>T. annulata</i>			
		Positivo	Negativo	Total	
Raza	Avileña-negra ibérica	Frecuencia	3	73	76
		Porcentaje	3,95	96,05	100
	Charolés	Frecuencia	4	16	20
		Porcentaje	20	80	100
	Frisona	Frecuencia	1	75	76
		Porcentaje	1,32	98,68	100
	Lidia	Frecuencia	4	22	26
		Porcentaje	15,38	84,62	100
	Limusín	Frecuencia	7	15	22
		Porcentaje	31,82	68,18	100
	Conjunto mestizo	Frecuencia	87	102	189
		Porcentaje	46,03	53,97	100
	Rubia de Aquitania	Frecuencia	0	37	37
		Porcentaje	0	100	100
	Rubia gallega	Frecuencia	0	24	24
		Porcentaje	0	100	100
	Otras razas	Frecuencia	5	20	25
		Porcentaje	20	80	100
Total	Frecuencia	111	384	495	
	Porcentaje	22,42	77,58	100	

Tabla 75. Relación entre la amplificación de *T. annulata* y la raza

No se encontró asociación entre el **sexo** de los animales y la amplificación de ADN *T. annulata* ( $p=0,418$ ). Las hembras presentaron un 22% (103/468) de prevalencia y los machos un 28,57% (8/28).

Los grupos de **edad** no se asociaron estadísticamente con el agente estudiado ( $p=0,56$ ). Sin embargo, aunque la **edad** como variable categórica no estuviera asociada estadísticamente, sí se encontró asociación cuando se trató esta variable de forma numérica ( $p=0,0385$ ) (**Tabla 76** y **Gráfico 16**). Los animales que presentaron amplificación de ADN de *T. annulata* tenían una media de edad de  $6,27 \pm 4,44$  años (0,48-18,33 años) y los animales sin amplificación  $5,3 \pm 3,69$  años de media (0,35-17,59 años).

		PCR <i>T. annulata</i>			
		Positivo	Negativo	Total	
Grupos de Edad	Terneros (<1 año)	Frecuencia	2	13	15
		Porcentaje	13,33	86,67	100
	Jóvenes (1-3 años)	Frecuencia	27	108	135
		Porcentaje	20	80	100
	Adultos (>3-8 años)	Frecuencia	53	179	232
		Porcentaje	22,84	77,16	100
	Geriátricos (>8 años)	Frecuencia	29	82	111
		Porcentaje	26,13	73,87	100
Total	Frecuencia	111	382	493	
	Porcentaje	22,52	77,48	100	

Tabla 76. Relación entre la amplificación de *T. annulata* y los grupos de edadGráfico 16. Porcentaje de animales positivos a *T. annulata* en los diferentes grupos de edad

#### ○ Distribución geográfica

En la siguiente tabla se muestra la distribución de los animales en función de la granja y municipio al que pertenecían, así como la zona (**Tabla 78**).

Zona	Municipio	Número de animales positivos en relación al número de animales muestreados (porcentaje)	Nº de Granja	Número de animales positivos en relación al número de animales muestreados (porcentaje)	Número total de animales positivos en relación al número total de animales muestreados (porcentaje)
<b>M</b>	Bustarviejo	2/21 (9,52%)	<b>20</b>	2/21 (9,52%)	13/89 (14,61%)
	Cercedilla	0/14 (0%)	<b>4</b>	0/3 (0%)	
			<b>27</b>	0/11 (0%)	
	Los Molinos	10/16 (62,5%)	<b>24</b>	0/6 (0%)	
			<b>25</b>	10/10 (100%)	
	Prádena del Rincón	0/25 (0%)	<b>28</b>	0/25 (0%)	
	Robledo de Chavela	1/6 (16,67%)*	<b>1</b>	1/6 (16,67%)	
	Somosierra	0/7 (0%)	<b>22</b>	0/7 (0%)	
<b>F</b>	Becerril de la Sierra	5/11 (45,45%)	<b>6</b>	5/5 (100%)	49/293 (16,72%)
			<b>12</b>	0/6 (0%)	
	Cabanillas de la Sierra	5/30 (16,67%)	<b>29</b>	5/30 (16,67%)	
	Collado Villalba	5/21 (23,81%)	<b>17</b>	1/15 (6,67%)	
			<b>23</b>	4/6 (66,67%)	
	Colmenar Viejo	2/25 (8%)	<b>30</b>	2/25 (8%)	
	El Boalo	2/19 (10,53%)	<b>11</b>	2/5 (40%)	
			<b>19</b>	0/14 (0%)	
	Fresnedillas de la Oliva	4/4 (100%)	<b>21</b>	4/4 (100%)	
	Gascones	1/45 (2,22%)	<b>13</b>	1/20 (5%)	
			<b>33</b>	0/25 (0%)	
	Guadarrama	3/10 (30%)	<b>8</b>	3/10 (30%)	
	Manzanares El Real	0/20 (0%)	<b>2</b>	0/20 (0%)	
	Mataelpino	0/3 (0%)	<b>3</b>	0/3 (0%)	
	Moralzarzal	0/2 (0%)	<b>7</b>	0/2 (0%)	
	Pedrezuela	19/20 (95%)	<b>5</b>	19/20 (95%)	
	Robledo de Chavela	3/31 (9,67%)*	<b>34</b>	2/17 (11,76%)	
			<b>35</b>	1/14 (7,14%)	
<b>C</b>	Soto del Real	0/52 (0%)	<b>14</b>	0/31 (0%)	49/114 (42,98%)
			<b>31</b>	0/9 (0%)	
	Getafe	15/15 (100%)	<b>32</b>	0/12 (0%)	
			<b>15</b>	15/15 (100%)	
			<b>26</b>	25/25 (100%)	
	Rivas-Vaciamadrid	0/50 (0%)	<b>18</b>	0/50 (0%)	
	Tres Cantos	9/10 (90%)	<b>10</b>	9/10 (90%)	
	Villamantilla	0/14 (0%)	<b>9</b>	0/14 (0%)	

Tabla 77. Prevalencia de *T. annulata* en los diferentes municipios y granjas muestreados

\*Dos de las tres granjas muestreadas del municipio de Robledo de Chavela pertenecen a la zona F y una a la zona M

Se encontró asociación estadísticamente significativa entre la **granja** de procedencia de los animales y la amplificación de ADN de *T. annulata* ( $p < 0,0001$ ). En 16 de las 34 granjas no se detectó el agente, mientras que en ocho de las 18 granjas positivas se encontraron prevalencias por encima del 50%, destacando que cinco de ellas presentaron una prevalencia del 100% (**Tabla 77**).

En 15 de los 24 municipios se detectó amplificación de ADN de este agente, siendo los municipios de Fresnedillas de la Oliva, Navalagamella y Getafe (concretamente en el barrio de Perales del Río) los de mayor prevalencia (100%) y Gascones el de menor prevalencia (2,22%), como puede observarse en la **Tabla 77** e **Imagen 20**. Los **municipios** de procedencia de los animales estuvieron asociados estadísticamente con la positividad a *T. annulata* ( $p < 0,0001$ ).

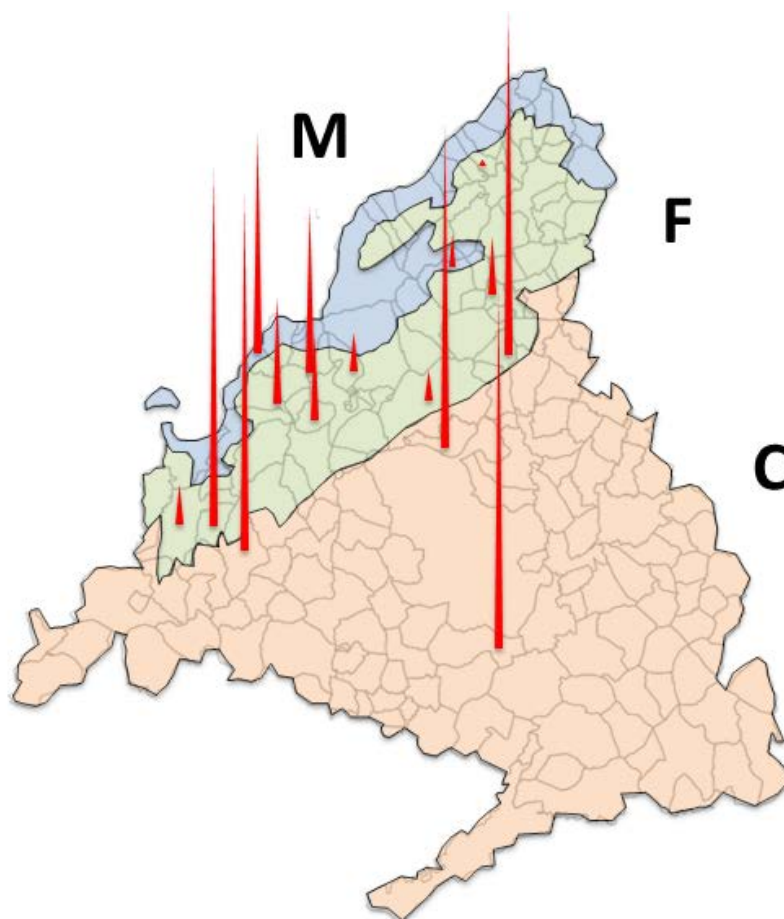


Imagen 20. Mapa con los municipios y su prevalencia de *T. annulata*

La **zona** también presentó asociaciones estadísticamente significativas con el agente estudiado ( $p < 0,0001$ ). Concretamente, la zona cálida (C) fue la de mayor



prevalencia (42,98%) de forma estadísticamente significativa, al compararse con la zona de montaña (M,  $p < 0,0001$ ) y la zona fresca (F,  $p < 0,0001$ ).

Se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre el agente estudiado y la variable **altitud** ( $p < 0,0001$ ). Los animales que presentaron amplificación de ADN de *T. annulata* se encontraban a una altitud media de  $854,1 \pm 196,2$  metros frente a los animales en los que no se detectó este agente, con una altitud media de  $959,9 \pm 219,5$  metros.

○ Momento de la recogida de las muestras

El **mes de recogida** de las muestras estuvo asociado estadísticamente con la amplificación de ADN de *T. annulata* ( $p < 0,0001$ ) (**Tabla 78** y **Gráfico 17**). En agosto no se amplificó ADN del agente en ninguna muestra recogida, mientras que los meses de septiembre y abril presentaron las mayores prevalencias, 67,24 y 38,46%, respectivamente.

		PCR <i>T. annulata</i>			
		Positivo	Negativo	Total	
Mes de Recogida	Abril	Frecuencia	20	32	52
		Porcentaje	38,46	61,54	100
	Mayo	Frecuencia	36	147	183
		Porcentaje	19,67	80,33	100
	Junio	Frecuencia	6	33	39
		Porcentaje	15,38	84,62	100
	Agosto	Frecuencia	0	7	7
		Porcentaje	0	100	100
	Septiembre	Frecuencia	39	19	58
		Porcentaje	67,24	32,76	100
	Octubre	Frecuencia	10	147	157
		Porcentaje	6,37	93,63	100
Total	Frecuencia	111	385	496	
	Porcentaje	22,38	77,62	100	

Tabla 78. Relación entre la amplificación de *T. annulata* y el mes de la toma de muestras

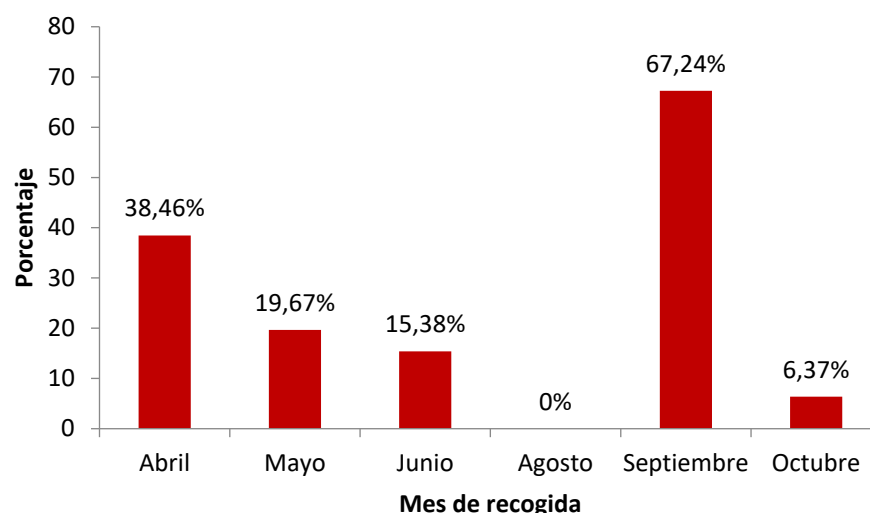


Gráfico 17. Porcentaje de animales positivos a *T. annulata* en relación con el mes de la toma de muestras

La **estación del año** ( $p=0,983$ ) no estaba asociada estadísticamente con la detección de *T. annulata*. Las tres estaciones presentaron prevalencias muy similares: en primavera fue del 22,63% (62/274), en verano fue del 21,05% (4/19) y en otoño fue del 22,17% (45/203).

La variable **temperatura** se encontró asociada estadísticamente con el agente estudiado ( $p<0,0001$ ). Los animales que presentaron amplificación de ADN de *T. annulata* se encontraron a una temperatura media de  $17,48 \pm 3,29^{\circ}\text{C}$  mientras que en la recogida de muestras de los animales que resultaron negativos a la PCR se registraron valores inferiores, con una temperatura media de  $15,58 \pm 4,32^{\circ}\text{C}$ .

La **humedad relativa** no presentó asociaciones estadísticamente significativas con *T. annulata* ( $p=0,51$ ). Los animales positivos se encontraron con un valor medio de  $52,68 \pm 14,11\%$  y los animales negativos tuvieron un valor medio de humedad relativa de  $53,73 \pm 14,98\%$ .

#### ○ Características del sistema productivo de las granjas estudiadas

No se encontraron asociaciones entre la **densidad** de animales en la granja y el agente estudiado ( $p=0,8$ ). Los animales positivos presentaron una densidad media de  $0,81 \pm 0,84$  animales/ha y los animales sin amplificación de ADN del agente obtuvieron una media de  $0,83 \pm 0,5$  animales/ha.

Se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre la **introducción de nuevos animales** y la amplificación de ADN de *T. annulata* ( $p<0,0001$ , OR=2,9, IC al 95% de 1,67 a 5,02). Como se puede observar en la **Tabla 79**, introducir animales es un factor de riesgo para la infección del agente, con una prevalencia de 27,71% en los bovinos procedentes de granjas donde se realizó este manejo frente al 11,69% en los casos de no exposición a esta variable (11,69%).

		PCR <i>T. annulata</i>		
		Positivo	Negativo	Total
Introducción de Animales	Sí	Frecuencia	87	227
		Porcentaje	27,71	72,29
	No	Frecuencia	18	136
		Porcentaje	11,69	88,31
	Total	Frecuencia	105	363
		Porcentaje	22,44	77,56

Tabla 79. Relación entre la amplificación de *T. annulata* y la introducción de animales

**Compartir pastos** con otros rebaños de ganado vacuno es otro factor de riesgo asociado estadísticamente con la amplificación de ADN de *T. annulata* ( $p=0,0023$ , OR=2,0, IC al 95% de 1,27 a 3,15). La prevalencia de los animales que compartían pastos fue del 31,43%, a diferencia del 22,44% de los animales que se encontraban solos pastando (**Tabla 80**).

		PCR <i>T. annulata</i>		
		Positivo	Negativo	Total
Pastos	Compartidos	Frecuencia	44	96
		Porcentaje	31,43	68,57
	No compartidos	Frecuencia	61	267
		Porcentaje	18,6	81,4
	Total	Frecuencia	105	363
		Porcentaje	22,44	77,56

Tabla 80. Relación entre la amplificación de *T. annulata* y los pastos

- Presencia de garrapatas en el momento de la toma de muestras y tratamientos antiparasitarios empleado

No se encontró asociación entre la **presencia de garrapatas** en el momento del muestreo y la amplificación de ADN de este agente ( $p=0,846$ ). La prevalencia en los animales de granjas donde se registró la presencia de garrapatas durante la toma de

muestras fue del 22,89% (38/166) y la prevalencia de los animales de granjas donde no se registraron fue del 22,12% (73/330).

En cuanto a los tratamientos antiparasitarios empleados, se encontraron asociaciones entre el hecho de **desparasitar** y la positividad al agente ( $p=0,0005$ ,  $OR=6,31$ , IC al 95% de 1,94 a 20,57). Los animales pertenecientes a granjas donde se desparasitaba presentaron una mayor prevalencia, del 24,94%, frente al 5% de los animales que no se desparasitaban, tal y como se muestra en la **Tabla 81**.

		PCR <i>T. annulata</i>		
		Positivo	Negativo	Total
Desparasitación	Sí	Frecuencia	108	325
		Porcentaje	24,94	75,06
	No	Frecuencia	3	57
		Porcentaje	5	95
	Total	Frecuencia	111	382
		Porcentaje	22,52	77,48

Tabla 81. Relación entre la amplificación de *T. annulata* y si desparasitan o no

Sin embargo, cuando vemos el **número de veces** que se realizaban estas desparasitaciones al año, se observa que en los casos de desparasitación una vez al año la prevalencia era mayor (45,19%) que cuando se realizaba dos o más veces al año (16,03 y 13,89%, respectivamente, **Tabla 82**). Esta variable estuvo asociada con la amplificación del agente tanto manejándola como variable categórica ( $p<0,0001$ ) como si se considera una variable numérica ( $p=0,039$ ). Se determinó que los animales con amplificación de ADN de *T. annulata* presentaron de media  $1,48 \pm 0,76$  desparasitaciones al año frente a los animales que no presentaron amplificación, con una media de  $1,67 \pm 1,0$  desparasitaciones al año.

		PCR <i>T. annulata</i>			
			Positivo	Negativo	Total
Número de desparasitaciones al año	Ninguna	Frecuencia	3	57	60
		Porcentaje	5	95	100
	1 vez al año	Frecuencia	61	74	135
		Porcentaje	45,19	54,81	100
	2 veces al año	Frecuencia	42	220	262
		Porcentaje	16,03	83,97	100
	Más de 2 veces al año	Frecuencia	5	31	36
		Porcentaje	13,89	86,11	100
	Total	Frecuencia	111	382	493
		Porcentaje	22,52	77,48	100

Tabla 82. Relación entre la amplificación de *T. annulata* y número de desparasitaciones al año

Los animales que presentaron mayor prevalencia de *T. annulata* fueron aquellos desparasitados con lactonas macrocíclicas (28,32%), mientras que aquellos animales desparasitados con piretroides, lactonas macrocíclicas y organofosforados obtuvieron la menor prevalencia (0%). El fármaco empleado y la amplificación de ADN de este agente estuvieron asociados estadísticamente ( $p < 0,0001$ , **Tabla 83**).

		PCR <i>T. annulata</i>			
		Positivo	Negativo	Total	
Fármaco empleado	Ninguno	Frecuencia	3	57	60
		Porcentaje	5	95	100
	Piretroides	Frecuencia	7	31	38
		Porcentaje	18,42	81,58	100
	Lactonas macrocíclicas	Frecuencia	64	162	226
		Porcentaje	28,32	71,68	100
	Piretroides y L. macrocíclicas	Frecuencia	12	101	113
		Porcentaje	10,62	89,38	100
	Piretroides, L. macrocíclicas y Organofosforados	Frecuencia	0	31	31
		Porcentaje	0	100	100
Total	Frecuencia	86	382	468	
	Porcentaje	18,38	81,62	100	

Tabla 83. Relación entre la amplificación de *T. annulata* y fármaco empleado

○ Historial de enfermedades transmitidas por garrapatas

La descripción de **casos previos** de enfermedades transmitidas por garrapatas en la explotación se asoció estadísticamente con la amplificación de ADN de *T. annulata* en las muestras de los animales ( $p = 0,0285$ , OR=1,7, IC al 95% de 1,05 a 2,64). El 29,1% de los animales con el agente procedían de granjas donde se dieron signos clínicos

asociados con theileriosis (fiebre alta, linfadenomegalia, anemia, etc.), mientras que los animales muestreados en granjas sin casos clínicos registrados presentaron una prevalencia inferior (19,76%) (**Tabla 84**).

		PCR <i>T. annulata</i>		
		Positivo	Negativo	Total
Casos Previos	Sí	Frecuencia	39	95
		Porcentaje	29,1	70,9
	No	Frecuencia	66	268
		Porcentaje	19,76	80,24
	Total	Frecuencia	105	363
		Porcentaje	22,44	77,56

Tabla 84. Relación entre la amplificación de *T. annulata* y los casos previos

○ Contacto con animales de otras especies

- *Contacto con otros animales domésticos*

Con respecto al contacto con **animales domésticos**, se encontró asociación estadísticamente significativa con el agente amplificado en la PCR ( $p=0,0004$ ,  $OR=0,45$ , IC al 95% de 0,29 a 0,70). Como se puede observar en la **Tabla 85**, los animales domésticos son un factor de protección frente la infección de *T. annulata*, ya que los animales que se encontraron en contacto con otros animales domésticos presentaron menor prevalencia. Mayoritariamente fueron caballos, aunque en dos granjas además se registró la presencia de perros.

		PCR <i>T. annulata</i>		
		Positivo	Negativo	Total
Presencia de Animales Domésticos	Sí	Frecuencia	38	204
		Porcentaje	15,7	84,3
	No	Frecuencia	67	162
		Porcentaje	29,26	70,74
	Total	Frecuencia	105	366
		Porcentaje	22,29	77,71

Tabla 85. Relación entre la amplificación de *T. annulata* y la presencia de animales domésticos

- *Contacto con fauna silvestre*

Con respecto al contacto con **animales silvestres**, se encontró asociación entre la detección de *T. annulata* y la presencia de todos los grupos de animales silvestres registrados, salvo con la **presencia de ruminantes silvestres** ( $p=0,288$ ). Los animales

que compartían pastos con otros rumiantes silvestres presentaron una prevalencia del 20,79% (63/303) y la prevalencia de aquellos animales que no tenían contacto con rumiantes silvestres fue del 24,87% (48/193).

La presencia de **jabalíes** fue un factor de riesgo para presentar amplificación de ADN del agente ( $p=0,0010$ ,  $OR=3,6$ , IC al 95% de 1,60 a 8,05), como se puede observar en la **Tabla 86**, con una prevalencia del 25,12% cuando los animales se encontraron en zonas con jabalíes a diferencia del 8,54% de prevalencia en animales de zonas sin jabalíes.

Se asoció estadísticamente la presencia de **carnívoros silvestres** con la amplificación de *T. annulata*, que en este caso se presenta como un factor de protección ( $p<0,0001$ ,  $OR=0,3$ , IC al 95% de 0,17 a 0,44): los animales de zonas donde se registró la presencia de estos carnívoros presentaron una prevalencia del 11,89%, mientras que la prevalencia fue del 32,54% en los animales de zonas sin registro de carnívoros silvestres.

La presencia de **conejos** y las **liebres** se relacionó estadísticamente con la positividad a *T. annulata* ( $p<0,0001$ ,  $OR=0,7$ , IC al 95% de 0,70 a 0,78). Como se muestra en la **Tabla 86**, todos los animales positivos al agente estudiado se encontraban en contacto con conejos y/o liebres.

La prevalencia entre los animales provenientes de granjas con registro de presencia de **aves rapaces** fue del 8,54%, mientras que en zonas donde no se registraron, la prevalencia fue del 36%, como se observa en la **Tabla 86**. Se encontraron asociaciones significativas entre esta variable y la positividad a *T. annulata* ( $p<0,0001$ ,  $OR=0,16$ , IC al 95% de 0,09 a 0,28), considerándose, al igual que en el caso del contacto con carnívoros, como un factor de protección frente a *T. annulata*.

Resultados de la PCR de <i>T. annulata</i>				
Presencia de:		Número de animales positivos (porcentaje)	Número de animales negativos (porcentaje)	Número total de animales (porcentaje)
<b>Jabalíes</b>	Sí	104 (25,12%)	310 (74,88%)	414 (83,47%)
	No	7 (8,54%)	75 (91,46%)	82 (16,53%)
<b>Carnívoros silvestres</b>	Sí	29 (11,89%)	215 (88,11%)	244 (49,19%)
	No	82 (32,54%)	170 (67,46%)	252 (50,81%)
<b>Conejos y liebres</b>	Sí	111 (25,75%)	320 (74,25%)	431 (86,9%)
	No	0 (0%)	65 (100%)	65 (13,1%)
<b>Rumiantes silvestres</b>	Sí	63 (20,79%)	240 (79,21%)	303 (61%)
	No	48 (24,87%)	145 (75,13%)	193 (39%)
<b>Aves rapaces</b>	Sí	21 (8,54%)	225 (91,46%)	246 (49,6%)
	No	90 (36%)	160 (64%)	250 (50,4%)

Tabla 86. Relación entre la amplificación de *T. annulata* y la presencia de animales silvestres

### 5.3.6.3. Relación entre la positividad a *T. annulata* y los resultados de la hematología y de la bioquímica sanguínea de los animales incluidos en el estudio

En la siguiente tabla se observan los **valores analíticos** medios y la desviación estándar, así como los valores mínimos y máximos de los diferentes parámetros de las analíticas sanguíneas de los animales positivos y negativos a la PCR del agente estudiado (**Tabla 87**).

Resultados de la PCR de <i>T. annulata</i>							
Parámetros Hematológicos	Animales positivos			Animales negativos			p
	Media ± DE	Mínimo	Máximo	Media ± DE	Mínimo	Máximo	
Glóbulos rojos (10 <sup>6</sup> /μl)	6,96 ± 1,08	4,76	10,44	7,14 ± 1,42	4,33	13,74	0,21
Hemoglobina (g/dl)	12,54 ± 1,24	8,20	16,10	12,26 ± 1,72	8,10	17,90	0,09
Hematocrito (%)	32,47 ± 3,32	21,70	42,50	31,52 ± 4,72	21,30	46,70	<b>0,04</b>
VCM (fl)	47,25 ± 5,23	31,50	60,50	44,73 ± 4,84	27,90	59,50	<b>&lt; 0,0001</b>
HCM (pg)	18,26 ± 2,07	12,60	23,70	17,46 ± 1,95	11,30	23,60	<b>0,0012</b>
CHCM (g/dl)	38,65 ± 1,08	35,80	43,50	39,01 ± 0,98	36,20	41,10	<b>0,0036</b>
Leucocitos (10 <sup>3</sup> /μl)	8,82 ± 2,19	4,99	13,63	9,22 ± 2,84	2,99	20,18	0,16
Neutrófilos (10 <sup>3</sup> /μl)	2,29 ± 0,98	0,50	4,70	2,54 ± 1,22	0,30	8,90	0,05
Linfocitos (10 <sup>3</sup> /μl)	5,1 ± 2,0	1,00	11,10	5,34 ± 2,21	0,60	13,10	0,3
Monocitos (10 <sup>3</sup> /μl)	0,42 ± 0,21	0,10	1,00	0,41 ± 0,23	0,00	1,80	0,6



Eosinófilos ( $10^3/\mu\text{l}$ )	$0,95 \pm 0,56$	0,10	2,90	$0,82 \pm 0,49$	0,10	2,80	<b>0,048</b>
Basófilos ( $10^3/\mu\text{l}$ )	$0,06 \pm 0,05$	0,00	0,30	$0,08 \pm 0,06$	0,00	0,50	<b>0,0036</b>
Plaquetas ( $10^3/\mu\text{l}$ )	$212 \pm 144,5$	35,00	1203,00	$261,8 \pm 127,2$	28,00	923,00	<b>0,0024</b>
AST (U/l)	$98,95 \pm 30,0$	52,00	206,00	$116,7 \pm 164,0$	53,00	1805,00	0,09
ALT (U/l)	$32,05 \pm 9,63$	11,00	58,00	$43,6 \pm 34,5$	8,00	394,00	<b>&lt; 0,0001</b>
Proteínas Totales (g/dl)	$7,57 \pm 0,7$	6,00	9,00	$7,49 \pm 0,75$	5,70	10,40	0,38

Tabla 87. Relación entre la amplificación de *T. annulata* y los parámetros hematológicos y de la bioquímica sanguínea (DE, desviación estándar. Se resaltan en negrita los valores de p inferiores a 0,05)

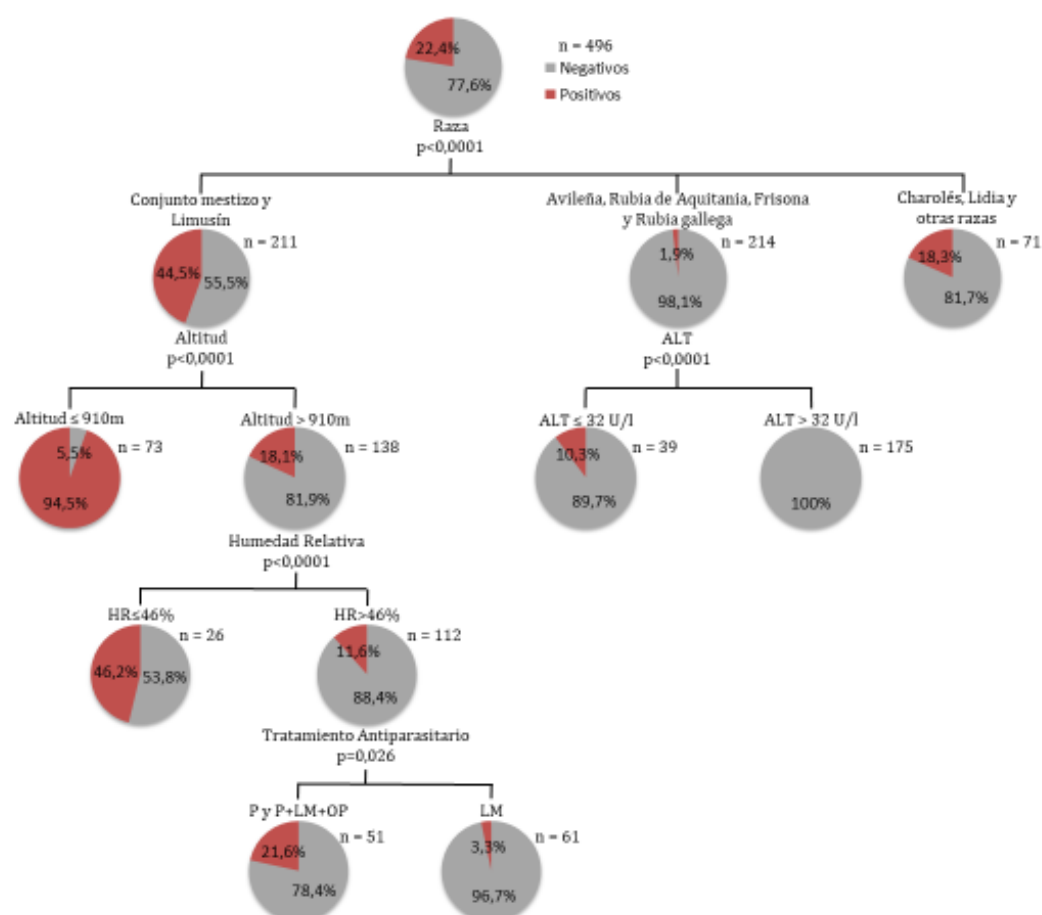
Todos los valores medios se encontraron dentro del rango de referencia, salvo en el caso de las enzimas hepáticas, encontrándose un valor medio de ALT y AST ligeramente por encima del rango de referencia para la especie en los bovinos negativos a *T. annulata*.

Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los animales positivos y negativos a *T. annulata* en los parámetros de la serie roja: hematocrito, VCM y HCM, con valores medios mayores en los animales positivos que en los negativos ( $p=0,04$ ,  $p<0,0001$  y  $p=0,0012$ , respectivamente), mientras que los resultados de CHCM fueron menores en los animales positivos ( $p=0,0036$ ). Los recuentos de basófilos y plaquetas fueron inferiores en los animales positivos ( $p=0,036$  y  $p=0,0024$ , respectivamente) y los recuentos medios de eosinófilos fueron mayores ( $p=0,048$ ), con diferencias estadísticamente significativas.

En relación a la bioquímica, los animales positivos a la PCR de *T. annulata* mostraron un valor medio de ALT inferior que los negativos.

#### 5.3.6.4. Árbol de decisión de *T. annulata*

El mayor porcentaje de animales positivos (94,5%) son de las razas limusín y conjunto mestizo que se encuentra a una altitud media inferior o igual a 910 m (**Imagen 21**).

Imagen 21. Árbol de decisión de *T. annulata*

### 5.3.7. PRESENCIA DE COINFECCIONES EN LOS ANIMALES DEL ESTUDIO

#### 5.3.7.1. Prevalencia de coinfecciones en la Comunidad de Madrid

Los resultados de las PCRs realizadas han mostrado la presencia de coinfecciones por varios de los agentes estudiados. En total, fueron detectados dos o más agentes en 97 bovinos del estudio, lo que supone una prevalencia de coinfecciones en la muestra de estudio del  $19,5 \pm 3,53\%$  (IC al 95% de 16,1 a 23%), mientras que los animales positivos a un solo agente fueron el 34,7% (172/496). Concretamente, estos animales a partir de cuyas muestras sanguíneas se amplificó ADN de más de un agente procedían de 18 granjas, lo que implica la presencia de coinfecciones en el 52,9% de las granjas muestreadas. En la **Tabla 88** se muestra el número de animales, así como el número de granjas a las que pertenecían dichos animales que fueron positivos a uno, dos o tres agentes, así como de los negativos a todos.

Animales		
	Frecuencia	Porcentaje
<b>Negativos</b>	227	45,8
<b>Positividad a un solo agente</b>	172	34,7
<b>Positividad a dos agentes</b>	74	14,9
<b>Positividad a tres agentes</b>	23	4,6
<b>Total</b>	496	100

Tabla 88. Prevalencia de ninguno, uno, dos o tres agentes en los animales del estudio

En la **Tabla 89** se muestran las relaciones observadas en los animales a partir de cuyas muestras sanguíneas se amplificó ADN de dos agentes simultáneamente. Esta situación se produjo en 74 de los 496 bovinos muestreados, lo que representa el 14,9%.

Animales	A. <i>phagocytophilum</i>	A. <i>marginale</i>	B. <i>bigemina</i>	B. <i>divergens</i>	T. <i>annulata</i>
<i>A. phagocytophilum</i>	-	4	0	0	0
<i>A. marginale</i>	4	-	29	0	32
<i>B. bigemina</i>	0	29	-	0	9
<i>B. divergens</i>	0	0	0	-	0
<i>T. annulata</i>	0	32	9	0	-
<b>Total</b>	74 (14,9%)				

Tabla 89. Número de animales con amplificación de ADN de dos agentes simultáneamente en las PCRs empleadas

En la siguiente tabla se detalla la relación de animales positivos a tres agentes. En 23 animales de los 496 muestreados (4,6%) se amplificaron tres agentes simultáneamente, siendo la combinación más frecuente *A. marginale*, *B. bigemina* y *T. annulata*, que afectaba a 13 animales (**Tabla 90**).

Animales			
<i>B. bigemina</i>	<i>B. divergens</i>	<i>T. annulata</i>	1
		<i>T. annulata</i>	13
	<i>A. marginale</i>	<i>B. divergens</i>	8
		<i>A. phagocytophilum</i>	1
<b>Total</b>			23 (4,6%)

Tabla 90. Distribución de los animales positivos a tres agentes amplificados simultáneamente

Por otra parte, aunque ningún bovino mostró coinfección con más de tres de los agentes estudiados, en dos granjas en concreto se detectaron cuatro agentes. En la nº 21, en Fresnedillas de la Oliva, se amplificó ADN de *A. marginale*, *B. bigemina*, *B. divergens* y *T. annulata* y en la granja nº 28, en Prádena del Rincón, se amplificó ADN de *A. phagocytophilum*, *A. marginale*, *B. bigemina* y *B. divergens*.

### 5.3.7.2. Asociaciones estadísticas entre los agentes estudiados

En el análisis estadístico realizado en busca de asociaciones entre los agentes estudiados se ha comprobado la existencia de asociación entre *A. marginale* y *B. bigemina* ( $p<0,0001$ ), *A. marginale* y *B. divergens* ( $p=0,003$ ), *A. marginale* y *T. annulata* ( $p=0,0062$ ) y *B. bigemina* y *B. divergens* ( $p<0,0001$ ) (Tablas 91 a 94).

		<i>B. bigemina</i>		
		Sí	No	Total
<i>A. marginale</i>	Sí	Frecuencia	51	98
		Porcentaje	34,23	65,77
	No	Frecuencia	58	289
		Porcentaje	16,71	83,29
	Total	Frecuencia	109	387
		Porcentaje	21,98	78,02

Tabla 91. Relación entre la positividad a *A. marginale* y *B. bigemina* en los animales del estudio

		<i>B. divergens</i>		
		Sí	No	Total
<i>A. marginale</i>	Sí	Frecuencia	8	141
		Porcentaje	5,37	94,63
	No	Frecuencia	3	344
		Porcentaje	0,86	99,14
	Total	Frecuencia	11	485
		Porcentaje	2,22	97,78

Tabla 92. Relación entre la positividad a *A. marginale* y *B. divergens* en los animales del estudio

		<i>T. annulata</i>		
		Sí	No	Total
<i>A. marginale</i>	Sí	Frecuencia	45	104
		Porcentaje	30,2	69,8
	No	Frecuencia	66	281
		Porcentaje	19,02	80,98
	Total	Frecuencia	111	385
		Porcentaje	22,38	77,62

Tabla 93. Relación entre la positividad a *A. marginale* y *T. annulata* en los animales del estudio

			<b><i>B. divergens</i></b>		
			Sí	No	Total
<b><i>B. bigemina</i></b>	Sí	Frecuencia	9	100	109
		Porcentaje	8,26	91,74	100
	No	Frecuencia	2	385	387
		Porcentaje	0,52	99,48	100
	<b>Total</b>	Frecuencia	11	485	496
		Porcentaje	2,22	97,78	100

Tabla 94. Relación entre la positividad a *B. bigemina* y *B. divergens* en los animales del estudio

Concretamente la coinfección más frecuentemente encontrada en este estudio fue la de *A. marginale* y *B. bigemina*, que afectó a 51 de los bovinos muestreados (lo que supone una prevalencia del 10,28%), seguida de la de *A. marginale* y *T. annulata*, que se detectó en 45 animales (9,07%). Las coinfecciones causadas por *A. marginale* y *B. divergens* y *B. bigemina* y *B. divergens* afectaron a ocho (1,61%) y nueve (1,81%) de los 496 bovinos del estudio.

No se encontró ninguna asociación entre la positividad mediante PCR a *A. phagocytophilum* y *A. marginale* ( $p=0,13$ ), *A. phagocytophilum* y *B. bigemina* ( $p=0,69$ ), *A. phagocytophilum* y *B. divergens* ( $p=1$ ), *A. phagocytophilum* y *T. annulata* ( $p=0,21$ ), *T. annulata* y *B. bigemina* ( $p=0,7$ ) y *T. annulata* y *B. divergens* ( $p=0,46$ ).

### 5.3.7.3. Relación entre la presencia de coinfecciones y los datos epidemiológicos recogidos

A continuación se detallan los resultados del estudio estadístico realizado comparando los datos epidemiológicos y de la analítica sanguínea entre los animales en cuyas muestras de sangre se detectaron dos o tres agentes y los animales en los que no se detectó ninguno. Asimismo, para facilitar la comprensión de estos resultados, se indican los valores de prevalencia en relación a la muestra completa del estudio, independientemente del número de agentes cuyo ADN pudiese ser amplificado en las muestras sanguíneas de los animales.

- Relación entre la prevalencia de coinfección con los datos de la reseña de los animales

Se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre la **raza** y la amplificación de ADN de dos o tres agentes de forma simultánea en las muestras sanguíneas ( $p<0,0001$ , en ambos casos), siendo las razas charolesa y conjunto mestizo

las de mayor frecuencia de presentación de coinfecciones por dos agentes y tres agentes, respectivamente. En la **Tabla 95** se muestra la relación entre la amplificación de ADN de un solo agente, las coinfecciones por dos o tres agentes y la ausencia de amplificación de ADN en las PCRs realizadas en el estudio en función de la raza de los animales.

Raza	PCR negativa para todos los agentes	Amplificación de ADN de un solo agente	Amplificación de ADN de dos agentes	Amplificación de ADN de tres agentes	Total
Avileña-negra ibérica	36	32	8	0	76
Charolés	4	5	10	1	20
Frisona	74	2	0	0	76
Lidia	22	4	0	0	26
Limusín	5	10	7	0	22
Conjunto mestizo	49	87	35	18	189
Rubia de Aquitania	24	13	0	0	37
Rubia gallega	3	14	5	2	24
Otras razas	10	4	9	2	25
<b>Total</b>	<b>227</b>	<b>171</b>	<b>74</b>	<b>23</b>	<b>495</b>

Tabla 95. Amplificación de ADN de uno, dos, tres agentes o ninguno en las PCRs realizadas en relación con las razas de los animales

Al evaluar la muestra completa de bovinos incluidos en este estudio, la raza que presentó una mayor prevalencia de coinfección por dos agentes fue la charolesa, con 10 animales positivos de los 20 muestreados (lo que supone una prevalencia del 50%), mientras que en las razas frisona, lidia y rubia gallega no se detectaron dos agentes de forma simultánea. Los animales de razas avileña-negra ibérica, frisona, lidia, limusín y rubia de Aquitania no presentaron amplificación de ADN de tres agentes simultáneamente en ningún caso. El mayor número de bovinos con coinfección por tres agentes pertenecían al grupo de conjunto mestizo.

El **sexo** no estuvo asociado estadísticamente con la positividad a dos ( $p=0,21$ ) o a tres agentes ( $p=0,08$ ) al comparar con la negatividad a todos los agentes estudiados. Al considerar la muestra total de animales del estudio, se observó que la prevalencia de coinfección por dos agentes fue de 14,53% (68/468) en las hembras y de 21,42% (6/28) en los machos, siendo de 4,27% (20/468) para las hembras y de 10,71% (3/28) para los machos en el caso de las coinfecciones por tres agentes.

En relación a la **edad**, no hubo diferencias estadísticamente significativas en la detección de dos o tres agentes simultáneamente mediante PCR en función del grupo de edad al que pertenecían los animales ( $p=0,17$  y  $p=0,31$ , respectivamente). Sin embargo, se encontró asociación cuando se trató esta variable de forma numérica ( $p=0,0447$ ) para las coinfecciones por dos agentes: los animales que presentaron amplificación de ADN de dos agentes tuvieron una media de edad de  $6,14 \pm 4,52$  años (0,62 a 18,1 años) y los animales sin amplificación de ADN de ningún agente fueron más jóvenes, con una media de  $4,98 \pm 3,3$  años (0,58 a 17,59 años). Los animales con amplificación de ADN de tres agentes fueron aún más jóvenes, con una media de  $3,7 \pm 2,42$  años (0,99 a 9,61 años). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre los animales positivos a dos agentes con los animales positivos a un solo agente, que presentaron una media de  $6,22 \pm 4,3$  años (0,35 a 18,33 años,  $p=0,88$ ).

○ Distribución geográfica

En las **Tablas 96 a 98** se muestra la relación entre la amplificación de ADN de un solo agente, las coinfecciones por dos o tres agentes y la ausencia de amplificación de ADN en las PCRs realizadas en el estudio en función de la granja, el municipio y la zona de procedencia de los animales.

Nº de Granja	Nº de agentes cuyo ADN fue amplificado en las PCRs realizadas				Total
	Ninguno	Uno	Dos	Tres	
1	0	4	2	0	6
2	9	11	0	0	20
3	2	1	0	0	3
4	3	0	0	0	3
5	0	3	9	8	20
6	0	2	2	1	5
7	2	0	0	0	2
8	7	3	0	0	10
9	14	0	0	0	14
10	1	5	3	1	10
11	2	1	2	0	5
12	6	0	0	0	6
13	3	10	7	0	20
14	20	11	0	0	31
15	0	11	3	1	15
17	14	1	0	0	15
18	50	0	0	0	50
19	13	1	0	0	14
20	12	8	1	0	21
21	0	0	3	1	4

22	5	2	0	0	7
23	1	2	3	0	6
24	5	1	0	0	6
25	0	3	6	1	10
26	0	25	0	0	25
27	10	1	0	0	11
28	1	9	8	7	25
29	6	14	9	1	30
30	15	5	5	0	25
31	0	6	3	0	9
32	5	5	2	0	12
33	3	15	5	2	25
34	6	10	1	0	17
35	12	2	0	0	14
<b>Total</b>	227	172	74	23	496

Tabla 96. Relación entre la detección mediante PCR de ninguno, uno, dos o tres agentes y la granja de procedencia de los animales

Los animales con amplificación de ADN de dos agentes pertenecían a 18 granjas, y los 23 animales que presentaron amplificación a tres agentes se encontraron en nueve de las 34 granjas del estudio. La **granja** de procedencia de los animales estuvo asociada estadísticamente con la amplificación de ADN de dos y de tres agentes con los protocolos de PCR empleados en esta tesis ( $p < 0,0001$  en ambos casos) (**Tabla 96**).

El **municipio** de procedencia de estos animales también se encontró asociado estadísticamente con la detección de dos y de tres agentes de forma concurrente en los animales del estudio ( $p < 0,0001$  en ambos casos). Concretamente en Gascones se detectaron 12 animales con coinfección por dos agentes, mientras que los municipios de Pedrezuela y Prádena del Rincón contaron con ocho y siete animales coinfectados por tres agentes, respectivamente (**Tabla 97**).

Municipio	Nº de agentes cuyo ADN fue amplificado en las PCRs realizadas				Total
	Ninguno	Uno	Dos	Tres	
Becerril de la Sierra	6	2	2	1	11
Bustarviejo	12	8	1	0	21
Cabanillas de la Sierra	6	14	9	1	30
Cercedilla	13	1	0	0	14
Colmenar Viejo	15	5	5	0	25
El Boalo	15	2	2	0	19
Fresnedillas de la Oliva	0	0	3	1	4
Gascones	6	25	12	2	45
Getafe	0	11	3	1	15



<b>Guadarrama</b>	7	3	0	0	10
<b>Los Molinos</b>	5	4	6	1	16
<b>Manzanares El Real</b>	9	11	0	0	20
<b>Mataelpino</b>	2	1	0	0	3
<b>Moralzarzal</b>	2	0	0	0	2
<b>Navalagamella</b>	0	25	0	0	25
<b>Pedrezuela</b>	0	3	9	8	20
<b>Prádena del Rincón</b>	1	9	8	7	25
<b>Rivas-Vaciamadrid</b>	50	0	0	0	50
<b>Robledo de Chavela</b>	18	16	3	0	37
<b>Somosierra</b>	5	2	0	0	7
<b>Soto del Real</b>	25	22	5	0	52
<b>Tres Cantos</b>	1	5	3	1	10
<b>Collado Villalba</b>	15	3	3	0	21
<b>Villamantilla</b>	14	0	0	0	14
<b>Total</b>	227	172	74	23	496

Tabla 97. Relación entre la detección mediante PCR de ninguno, uno, dos o tres agentes y el municipio de procedencia de los animales

La **zona** de procedencia de los animales y la positividad a dos y a tres agentes simultáneamente resultaron estar estadísticamente asociados ( $p < 0,0001$  y  $p = 0,025$ , respectivamente). La zona cálida (C) presentó las menores prevalencias de coinfección (Tabla 98).

Zona	Nº de agentes cuyo ADN fue amplificado en las PCRs empleadas				
	Ninguno	Uno	Dos	Tres	Total
M	36	28	17	8	89
F	126	103	51	13	293
C	65	41	6	2	114
<b>Total</b>	227	172	74	23	496

Tabla 98. Relación entre la detección mediante PCR de ninguno, uno, dos o tres agentes y la zona de procedencia de los animales

Se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre la detección de dos o tres agentes simultáneamente y la variable **altitud** ( $p < 0,0001$  y  $p = 0,046$ , respectivamente). Los animales que presentaron amplificación de ADN de dos agentes se encontraron a una altitud media mayor (media de  $1.000,9 \pm 171$  metros) que los animales en los que no se detectó ningún agente, que presentaron una altitud media de  $890,4 \pm 246,3$  metros. No se encontró asociación entre la amplificación de ADN de dos agentes simultáneamente y un único agente, siendo la altitud media en este último caso de  $960 \pm 188,2$  metros ( $p = 0,11$ ), ni con la amplificación de ADN de tres agentes ( $996,4 \pm 194,3$  metros,  $p = 0,08$ ).

Los animales que presentaron amplificación de ADN de tres agentes se encontraron a una altitud media superior que los animales sin amplificación de ningún agente ( $p=0,04$ ), mientras que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas con la altitud media de los animales que presentaron amplificación de ADN de un único agente ( $p=0,39$ ).

○ Momento de recogida de las muestras

El **mes de recogida** de las muestras estuvo asociado estadísticamente con la detección de dos o tres agentes de forma simultánea en los animales ( $p<0,0001$  en ambos casos, **Tabla 99**). En las muestras recogidas durante el mes de agosto no se produjo amplificación de ADN ni de dos ni de tres agentes de forma simultánea, mientras que en octubre se recogieron 33 de las 74 muestras con coinfección por dos agentes y 10 de las 23 con coinfección por tres agentes.

Mes de Recogida	Nº de agentes cuyo ADN fue amplificado en las PCRs empleadas				Total
	Ninguno	Uno	Dos	Tres	
Abril	14	19	11	8	52
Mayo	119	44	17	3	183
Junio	25	9	4	1	39
Agosto	5	2	0	0	7
Septiembre	16	32	9	1	58
Octubre	48	66	33	10	157
<b>Total</b>	227	172	74	23	496

Tabla 99. Relación entre la detección mediante PCR de ninguno, uno, dos o tres agentes y el mes de la toma de muestras

La **estación del año** de las muestras se encontró asociada estadísticamente con la amplificación de ADN de dos y de tres agentes ( $p<0,0001$  y  $p=0,05$ , respectivamente). La estación del año con mayor número de animales muestreados que resultaron positivos a dos agentes (39 animales) fue el otoño, siendo la primavera en el caso de la coinfección por tres agentes. En verano no se presentó amplificación de ADN de tres agentes simultáneamente en el mismo animal y tan solo se detectó coinfección con dos agentes en tres animales (**Tabla 100**).

Estación del Año	Nº de agentes cuyo ADN fue amplificado en las PCR realizadas				Total
	Ninguno	Uno	Dos	Tres	
Otoño	58	95	39	11	203
Primavera	158	72	32	12	274
Verano	11	5	3	0	19
<b>Total</b>	<b>227</b>	<b>172</b>	<b>74</b>	<b>23</b>	<b>496</b>

Tabla 100. Relación entre la detección mediante PCR de ninguno, uno, dos o tres agentes y la estación del año

Se encontró una asociación estadísticamente significativa entre la coinfección con dos agentes y la **temperatura** en el momento del muestreo ( $p=0,0005$ ), pero no entre la coinfección con tres agentes y esta variable ( $p=0,18$ ). Los animales que presentaron amplificación de ADN de dos agentes simultáneamente se encontraron a una temperatura media inferior, de  $15 \pm 3,92^{\circ}\text{C}$ , que los animales en los que no se detectó ningún agente, que mostraron una temperatura media de  $17 \pm 4,21^{\circ}\text{C}$ . En el caso de las coinfecciones por tres agentes, la temperatura media en el momento del muestreo fue de  $15,82 \pm 3,28^{\circ}\text{C}$ , siendo de  $15,05 \pm 4,07^{\circ}\text{C}$  en el muestreo de los animales positivos a un único agente.

Se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre la positividad a dos y a tres agentes y la variable **humedad relativa** ( $p<0,0001$  en ambos casos), siendo ésta superior en los animales con coinfección por tres agentes ( $65,6 \pm 13,06\%$ ) y con dos agentes ( $58,7 \pm 15,53\%$ ) que la registrada en los animales negativos, que de media fue de  $49 \pm 14,87\%$ . La humedad relativa media registrada en los animales en los que se detectó infección por un único agente también fue superior estadísticamente a la humedad relativa de los animales sin detección de ninguno, con una media en el primer caso de  $55,54 \pm 12,36\%$  ( $p<0,0001$ ).

○ Características del sistema productivo de las granjas estudiadas

Se encontraron asociaciones estadísticamente significativas entre la positividad a dos o a tres agentes y la variable **densidad de animales** ( $p=0,0023$  y  $p=0,0074$ , respectivamente). Los animales que presentaron amplificación de ADN de tres agentes y de dos agentes procedían de granjas con una densidad media de  $0,43 \pm 0,62$  animales/ha y  $0,68 \pm 0,64$  animales/ha, respectivamente, inferiores estadísticamente a la de las granjas de origen de los animales en los que no se amplificó ADN de ninguno de los agentes estudiados, con una media de  $0,96 \pm 0,44$  animales/ha. La densidad media encontrada en los animales con amplificación de ADN de un agente fue de  $0,74 \pm 0,67$  animales/ha.

La **introducción de nuevos animales** al rebaño no se asoció estadísticamente con la presencia de coinfecciones, ni con dos ni con tres agentes ( $p=0,11$  en ambos casos). Concretamente, en las explotaciones en las que eran introducidos nuevos animales se detectaron 50 casos de coinfección por dos agentes (lo que supone una prevalencia en la muestra total de 15,9%, al contar con un total de 314 bovinos expuestos a este manejo) y 19 de coinfección por tres agentes (6,05%), mientras que en las granjas que emplean para la cría animales propios se detectaron 20 casos de coinfección por dos agentes (20/154, 12,99%) y tres casos de coinfección por tres agentes (3/154, 1,94%) (**Tabla 101**).

Introducción de Animales	Nº de agentes cuyo ADN fue amplificado en las PCR's realizadas				Total
	Ninguno	Uno	Dos	Tres	
Sí	129	116	50	19	314
No	83	48	20	3	154
<b>Total</b>	212	164	70	22	468

Tabla 101. Relación entre la detección mediante PCR de ninguno, uno, dos o tres agentes y la introducción de animales

**Compartir pastos** se asoció estadísticamente con la existencia de coinfecciones, pudiendo ser considerado un factor de riesgo tanto para la detección de dos ( $p<0,0001$ , OR=9,8, IC al 95% de 5,33 a 18,30) como de tres agentes simultáneamente ( $p<0,0001$ , OR=26,27, IC al 95% de 8,33 a 82,84) (**Tabla 102**).

Pastos	Nº de agentes cuyo ADN fue amplificado en las PCR's realizadas				Total
	Ninguno	Uno	Dos	Tres	
Compartidos	31	47	44	18	140
No compartidos	181	117	26	4	328
<b>Total</b>	212	164	70	22	468

Tabla 102. Relación entre la amplificación de ADN de ninguno, uno, dos o tres agentes y el uso de pastos compartidos

Tal y como puede observarse en la **Tabla 102**, considerando el total de animales para los que se dispone de información sobre el empleo de pastos comunales (468), se detectó coinfección por dos agentes en el 31,42% de los casos (44/140) y por tres en el 12,85% de los casos (18/140), mientras que si no se empleaba este manejo de los pastos en la granja de origen las prevalencias detectadas fueron de 7,92% (26/328) y de 1,21% (4/328).

- Presencia de garrapatas en el momento de la toma de muestras y tratamientos antiparasitarios empleados

La **presencia de garrapatas** en el momento del muestreo se asoció estadísticamente con la detección de dos ( $p=0,0095$ ,  $OR=2,05$ , IC al 95% de 1,18 a 3,55) y de tres agentes simultáneamente ( $p=0,0263$ ,  $OR=2,61$ , IC al 95% de 1,09 a 6,23) en comparación con la ausencia de amplificación de ADN de los agentes estudiados, pudiendo considerarse un factor de riesgo para las coinfecciones por los agentes del estudio.

Tal y como puede observarse en la **Tabla 103**, en la muestra total de los bovinos incluidos en el estudio, en las explotaciones donde se registró la presencia de garrapatas en el momento de la toma de muestras se obtuvieron mayores prevalencias de coinfecciones (31/166, 18,67% en el caso de las causadas por dos agentes; y 11/166, 6,62%, en el caso de las causadas por tres agentes) que en las granjas donde no se encontraron garrapatas durante el muestreo (43/330, 13,03% para las causadas por dos agentes y 12/330, 3,63%, para las causadas por tres agentes). En el caso de un agente, la amplificación de ADN en presencia de garrapatas fue del 39,15% (65/166) y del 32,42% cuando no se detectaron garrapatas.

Presencia de Garrapatas	Nº de agentes cuyo ADN fue amplificado en las PCR realizadas				Total
	Ninguno	Uno	Dos	Tres	
Sí	59	65	31	11	166
No	168	107	43	12	330
<b>Total</b>	227	172	74	23	496

Tabla 103. Relación entre la amplificación de ADN de ninguno, uno, dos o tres agentes y la presencia de garrapatas

En referencia a los **tratamientos antiparasitarios**, se encontraron asociaciones entre el evento desparasitar y la amplificación de ADN de dos agentes ( $p<0,0001$ ,  $OR=0,69$ , IC al 95% de 0,63 a 0,75) y de tres agentes simultáneamente ( $p=0,0058$ ,  $OR=0,87$ , IC al 95% 0,83 a 0,92). Concretamente todos los casos de coinfecciones se produjeron en animales que eran desparasitados (**Tabla 104**).

Desparasitar	Nº de agentes cuyo ADN fue amplificado en las PCR's realizadas				Total
	Ninguno	Uno	Dos	Tres	
Sí	167	169	74	23	433
No	57	3	0	0	60
<b>Total</b>	224	172	74	23	493

Tabla 104. Relación entre la amplificación de ADN de ninguno, uno, dos o tres agentes y el evento desparasitar

El **número de veces** que se realizaban las desparasitaciones al año parece influir en la presencia de coinfecciones, con una mayor prevalencia de detección de dos agentes simultáneamente en animales que fueron desparasitados más de dos veces al año ( $p<0,0001$ ) y, por el contrario, con mayor prevalencia de coinfección por tres agentes si se desparasitaba una vez al año ( $p=0,038$ ). En la **tabla 105** puede observarse los datos del número de agentes cuyo ADN fue amplificado en función del número de desparasitaciones al año en la muestra total de animales del estudio.

Cuando se analizó esta variable desde el punto de vista cuantitativo, también se encontraron diferencias significativas para la presentación de coinfecciones. Se determinó que los animales con amplificación de ADN de dos agentes presentaron de media  $1,98 \pm 0,86$  desparasitaciones al año y los animales con amplificación de ADN de tres agentes una media de  $1,69 \pm 0,7$  desparasitaciones al año, frente a los que no presentaron amplificación de ADN de ningún agente, con una media de  $1,36 \pm 1,03$  desparasitaciones al año ( $p<0,0001$  y  $p=0,047$ , respectivamente). Los animales en cuya muestra sanguínea se detectó un solo agente eran desparasitados de media  $1,81 \pm 0,82$  veces al año.

Nº desparasitaciones al año	Nº de agentes cuyo ADN fue amplificado en las PCR's realizadas				Total
	Ninguno	Uno	Dos	Tres	
Ninguna	57	3	0	0	60
1 vez al año	53	54	19	9	135
2 veces al año	102	101	46	13	262
Más de 2 veces al año	12	14	9	1	36
<b>Total</b>	224	172	74	23	493

Tabla 105. Relación entre la amplificación de ADN de ninguno, uno, dos o tres agentes y el número de desparasitaciones al año

Se encontraron asociaciones entre el **fármaco empleado** para desparasitar y la amplificación de ADN de dos agentes ( $p<0,0001$ ) o de tres agentes ( $p=0,003$ ) en comparación con la ausencia de detección de los agentes estudiados.

Tal y como puede observarse en la **Tabla 106**, al considerar el total de animales incluidos en el estudio, las mayores prevalencias de coinfección por dos agentes se presentaron en los bovinos desparasitados con la combinación de piretroides y lactonas macrocíclicas (26/113, 23%) y con lactonas macrocíclicas únicamente (45/226, 19,91%). De forma similar, la mayor frecuencia de presentación de coinfecciones por tres agentes fue la hallada en los bovinos tratados con lactonas macrocíclicas (18/226, 7,96%), lo que implica que el 78,26% de los casos registrados con esta triple infección habían sido desparasitados con este grupo farmacológico. Los animales en los que se usó de la combinación de piretroides, lactonas macrocíclicas y organofosforados como tratamiento antiparasitario no mostraron ninguna coinfección.

Fármaco empleado	Nº de agentes cuyo ADN fue amplificado en las PCR's realizadas				Total
	Ninguno	Uno	Dos	Tres	
Ninguno	57	3	0	0	60
Piretroides	21	13	3	1	38
Lactonas macrocíclicas	89	74	45	18	226
Piretroides y L. macrocíclicas	37	46	26	4	113
Piretroides, L. macrocíclicas y Organofosforados	20	11	0	0	31
<b>Total</b>	224	147	74	23	468

Tabla 106. Relación entre la amplificación de ADN de ninguno, uno, dos o tres agentes y los tipos de tratamientos antiparasitarios empleados

○ Historial de enfermedades transmitidas por garrapatas

El estudio estadístico realizado ha confirmado la ausencia de asociación entre las coinfecciones por dos agentes y la descripción de **casos clínicos previos** en la granja de origen de los animales ( $p=0,06$ ), si bien cabe destacar que al considerar la muestra total de bovinos para los que fue posible disponer de este dato la prevalencia fue mayor si existía historial de enfermedades transmitidas por garrapatas, tal y como puede observarse en la Tabla 109. En el caso de las coinfecciones causadas por tres agentes, sí se encontró asociación estadísticamente significativa con la descripción de

casos previos ( $p=0,01$ ,  $OR=2,92$ , IC al 95% de 1,20 a 7,13), por lo que puede considerarse como un factor de riesgo.

Casos Previos	Nº de agentes cuyo ADN fue amplificado en las PCRs realizadas				Total
	Ninguno	Uno	Dos	Tres	
Sí	54	43	26	11	134
No	158	121	44	11	334
<b>Total</b>	212	164	70	22	468

Tabla 107. Relación entre la amplificación de ADN de ninguno, uno, dos o tres agentes y los casos clínicos

○ Contacto con animales de otras especies

▪ *Contacto con otros animales domésticos*

Con respecto al contacto con **animales domésticos**, al comparar los animales positivos a dos agentes de forma simultánea con los negativos a todos los agentes estudiados, se encontró asociación entre su presencia y la positividad a dos agentes ( $p=0,0036$ ,  $OR=0,44$ , IC al 95% de 0,25 a 0,77) o a tres agentes ( $p=0,034$ ,  $OR=0,39$ , IC al 95% de 0,16 a 0,95), siendo un factor de protección.

En la **tabla 108** se puede observar el número de animales con resultados negativos en todas las PCRs realizadas, los positivos a un único agente y los que presentaban coinfecciones (con dos o con tres agentes) en relación a su contacto con otros animales domésticos. Las prevalencias de coinfecciones fueron ligeramente superiores en los casos en los que no se registró presencia de animales domésticos en las granjas de origen de los animales, con valores de prevalencia de coinfección por dos agentes de 14,04% (34/242) y de 15,72% (36/229) en presencia y ausencia de animales domésticos, respectivamente. Por su parte, las prevalencias de coinfección por tres agentes fueron de 4,13% (10/242) y de 5,24% (12/229) en presencia o ausencia de estas otras especies domésticas, respectivamente.



Presencia de Animales Domésticos	Nº de agentes cuyo ADN fue amplificado en las PCR realizadas				Total
	Ninguno	Uno	Dos	Tres	
Sí	146	52	34	10	242
No	69	112	36	12	229
<b>Total</b>	215	164	70	22	471

Tabla 108. Relación entre la amplificación de ADN de ninguno, uno, dos o tres agentes y la presencia de animales domésticos

▪ *Contacto con fauna silvestre*

Se encontraron asociaciones entre la presencia de **animales silvestres** y la detección de coinfecciones en los animales del estudio. Concretamente, al comparar los bovinos con amplificación de ADN de varios agentes simultáneamente con los negativos a todas las PCR realizadas, el estudio estadístico mostró que pueden ser considerados como factores de riesgo para la coinfección por dos o tres agentes: la presencia de jabalíes ( $p=0,016$ , OR 2,5, IC al 95% 1,16 a 5,70; y  $p=0,005$ , OR=0,88, IC al 95% de 0,83 a 0,92, respectivamente) y rumiantes silvestres ( $p=0,0003$ , OR 2,7, IC al 95% 1,55 a 4,74; y  $p=0,0001$ , OR=8,1, IC al 95% de 2,36 a 28,27, respectivamente). Por el contrario, pueden considerarse como factores de protección para la coinfección por dos agentes o tres agentes: la presencia de carnívoros silvestres ( $p<0,0001$ , OR 0,2, IC al 95% 0,15 a 0,47; y  $p=0,0091$ , OR=0,3, IC al 95% 0,13 a 0,78, respectivamente) y aves rapaces ( $p<0,0001$ , OR 0,12, IC al 95% 0,06 a 0,22; y  $p=0,0037$ , OR=0,28, IC al 95% de 0,11 a 0,69, respectivamente). En el caso del contacto con conejo y liebres, no se encontró asociación estadísticamente significativa con la coinfección en los bovinos del estudio ( $p=0,198$  para la detección de dos agentes y  $p=0,54$  para la detección de tres agentes).

En la **tabla 109** se muestra el número de bovinos en cuyas muestras sanguíneas fueron detectados uno, dos o tres agentes, así como el número de bovinos en los que no se detectó ningún agente mediante PCR, en relación a su posible contacto con fauna silvestre.

		Nº de agentes cuyo ADN fue amplificado en las PCR realizadas				
Presencia de		Ninguno	Uno	Dos	Tres	Total
<b>Jabalíes</b>	Sí	173 (41,78%)	152 (36,71%)	66 (15,94%)	23 (5,55%)	414
	No	54 (65,85%)	20 (24,39%)	8 (9,75%)	0 (0%)	82
<b>Carnívoros silvestres</b>	Sí	151 (61,88%)	58 (23,77%)	26 (10,65%)	9 (3,68%)	244
	No	76 (30,16%)	114 (45,24%)	48 (19,04%)	14 (5,55%)	252
<b>Conejos y Liebres</b>	Si	192 (44,55%)	151 (35,03%)	67 (15,54%)	21 (4,87%)	431
	No	35 (53,85%)	21 (32,31%)	7 (10,76%)	2 (3,07%)	65
<b>Rumiantes silvestres</b>	Si	102 (33,66%)	130 (42,90%)	51 (16,83%)	20 (6,6%)	303
	No	125 (64,76%)	42 (21,76%)	23 (11,91%)	3 (1,55%)	193
<b>Aves rapaces</b>	Si	157 (63,82%)	64 (26,02%)	16 (6,50%)	9 (3,65%)	246
	No	70 (28%)	108 (43,2%)	58 (23,2%)	14 (5,6%)	250

Tabla 109. Relación entre la amplificación de ADN de ninguno, uno, dos o tres agentes y la fauna silvestre

#### 5.3.7.4. Relación entre la presencia de coinfecciones y los resultados de la hematología y de la bioquímica sanguínea de los animales incluidos en el estudio

En la siguiente tabla se observan los **valores analíticos** de los animales con amplificación de ADN de uno, dos o tres agentes, así como de los negativos a todas las PCR realizadas (**Tabla 110**). Todos los valores medios de la hematología se encontraron dentro de los rangos de referencia para la especie. La CHCM fue ligeramente superior estadísticamente en los animales coinfectados por dos agentes que en los animales negativos a todos ( $p=0,01$ ). Asimismo, tanto para las coinfecciones por dos como de tres agentes, los recuentos absolutos de leucocitos totales ( $p=0,007$  y  $p=0,001$ , respectivamente), linfocitos ( $p=0,005$  y  $p=0,03$ , respectivamente) y eosinófilos ( $p=0,03$  y  $p=0,01$ , respectivamente) fueron superiores estadísticamente que los de los bovinos negativos a todas las PCR realizadas. En cambio, el recuento plaquetar resultó ser estadísticamente menor en los casos de coinfección por dos agentes que en los negativos a todos ( $p=0,0008$ ).

En relación a la bioquímica, la concentración media de proteínas se encontró dentro del rango de referencia en todos los casos. Por el contrario, los valores medios de AST y ALT fueron ligeramente mayores al límite superior para la especie tanto en los bovinos negativos a todos los agentes como en los que presentaban amplificación a un agente y coinfección por tres agentes, manteniéndose en el rango de referencia en los que presentaban coinfección por dos agentes. El valor de ambas enzimas fue estadísticamente superior en los bovinos negativos a todos los agentes que en los coinfectados por dos ( $p=0,05$  para la AST y  $p=0,02$  para la ALT).

Parámetros Hematológicos	Nº de agentes cuyo ADN fue amplificado en las PCRs realizadas											
	Ninguno			Uno			Dos			Tres		
	Media ± DE	Mínimo	Máximo	Media ± DE	Mínimo	Máximo	Media ± DE	Mínimo	Máximo	Media ± DE	Mínimo	Máximo
Glóbulos rojos (10 <sup>6</sup> /μl)	7,08 ± 1,46	4,72	13,74	7,09 ± 1,27	4,76	11,44	7,17 ± 1,24	4,33	11,16	6,95 ± 1,09	5,01	9,19
Hemoglobina (g/dl)	12,26 ± 1,83	8,10	17,90	12,38 ± 1,42	9,20	17,30	12,43 ± 1,26	8,50	15,10	12,28 ± 1,81	8,20	16,10
Hematocrito (%)	31,49 ± 5,06	21,30	46,70	31,96 ± 3,89	24,00	43,90	32,13 ± 3,46	21,60	39,30	31,53 ± 4,42	21,70	39,90
VCM (fl)	45,01 ± 4,91	30,10	59,50	45,74 ± 5,21	27,90	56,50	45,46 ± 5,43	31,50	60,50	45,60 ± 3,99	36,20	51,90
HCM (pg)	17,60 ± 1,99	11,80	23,60	17,74 ± 2,07	11,30	23,00	17,58 ± 2,03	12,60	23,70	17,78 ± 1,79	13,40	20,20
CHCM (g/dl)	39,09 ± 0,93	36,50	41,10	38,78 ± 1,08	35,80	43,50	38,71 ± 0,98	36,20	41,00	38,93 ± 1,09	37,00	40,60
Leucocitos (10 <sup>3</sup> /μl)	8,56 ± 2,40	2,99	15,03	9,42 ± 2,90	4,78	20,18	9,63 ± 2,73	4,70	15,95	10,56 ± 2,63	7,13	16,66
Neutrófilos (10 <sup>3</sup> /μl)	2,59 ± 1,21	0,30	7,20	2,28 ± 1,13	0,50	8,90	2,43 ± 1,08	0,50	6,00	2,80 ± 1,08	1,50	4,80
Linfocitos (10 <sup>3</sup> /μl)	4,69 ± 1,79	0,60	10,30	5,70 ± 2,26	1,90	13,10	5,70 ± 2,36	1,00	11,40	6,20 ± 2,70	1,60	10,60
Monocitos (10 <sup>3</sup> /μl)	0,40 ± 0,21	0,10	1,50	0,41 ± 0,23	0,00	1,80	0,41 ± 0,23	0,10	1,00	0,42 ± 0,21	0,20	1,00
Eosinófilos (10 <sup>3</sup> /μl)	0,75 ± 0,44	0,10	2,60	0,91 ± 0,52	0,10	2,80	0,96 ± 0,65	0,20	2,90	1,02 ± 0,46	0,40	2,10
Basófilos (10 <sup>3</sup> /μl)	0,07 ± 0,05	0,00	0,50	0,07 ± 0,06	0,00	0,30	0,07 ± 0,04	0,00	0,20	0,08 ± 0,03	0,00	0,10
Plaquetas (10 <sup>3</sup> /μl)	267,4 ± 125,2	28,00	609,00	247,5 ± 153,7	40,00	1203,00	209,5 ± 98,21	39,00	465,00	221,5 ± 123,4	35,00	474,00
AST (U/l)	126,6 ± 208,3	53,00	1805,00	102,6 ± 37,27	52,00	343,00	94,64 ± 25,82	56,00	201,00	101,9 ± 25,39	72,00	179,00
ALT (U/l)	44,22 ± 42,89	8,00	394,00	38,57 ± 13,60	11,00	99,00	35,83 ± 11,95	14,00	63,00	38,33 ± 15,14	12,00	79,00
Proteínas Totales (g/dl)	7,42 ± 0,68	5,70	9,50	7,68 ± 0,76	5,70	10,40	7,44 ± 0,80	6,00	9,20	7,30 ± 0,58	6,00	8,30

Tabla 110. Resultados de la analítica sanguínea de los bovinos en cuyas muestras sanguíneas se detectaron uno, dos o tres agentes, así como de los negativos a todas las PCRs realizadas (DE, desviación estándar)

## 6. DISCUSIÓN



## 6.1. CARACTERIZACIÓN DE LOS ANIMALES INCLUIDOS EN EL ESTUDIO

A la hora de abordar este trabajo de investigación, cuyo objetivo general era la determinación de la importancia epidemiológica de las anaplasmosis causadas por *A. phagocytophilum*, *A. marginale* y *A. centrale*, de las babesiosis causadas por *B. bigemina* y *B. divergens*, así como de la theileriosis causada por *T. annulata* en el ganado vacuno en extensivo y semiextensivo de la Comunidad de Madrid, se consideró imprescindible realizar un correcto diseño de la muestra de bovinos a incluir. Para ello fue preciso considerar no solo el censo ganadero de la región, sino también su distribución en las diferentes zonas climáticas, dada la importancia de las condiciones climáticas y geográficas en la epidemiología de agentes patógenos que dependen de garrapatas para su transmisión (Estrada-Peña, 2001).

Tras el estudio minucioso descrito en apartados anteriores de esta memoria de tesis doctoral, finalmente fueron incluidos 496 bovinos pertenecientes a 34 ganaderías de extensivo de la Comunidad de Madrid. Casi el 60% de los animales pertenecen a la zona F, de clima mediterráneo continentalizado con veranos frescos; en torno al 23% a la zona C, de clima mediterráneo continentalizado con veranos cálidos; y en torno al 18% a la zona M, de clima de montaña. Con este muestreo se considera, en primer lugar, que se cumplen los objetivos inicialmente marcados en cuanto a tamaño muestral por zonas de esta región del centro de España, siendo un fiel reflejo de la distribución del censo ganadero en extensivo de la Comunidad de Madrid. En segundo lugar, y de forma relacionada, se asegura que los resultados epidemiológicos conseguidos tras el análisis molecular de las muestras sanguíneas y análisis estadístico de los datos de los animales son representativos de la situación existente en la ganadería en extensivo de Madrid.

No obstante, en la interpretación de los resultados epidemiológicos que han sido mostrados en el apartado de resultados y que serán discutidos a continuación, debe tenerse en cuenta algunos datos de interés de la muestra de bovinos seleccionada. Así, los bovinos del estudio pertenecían a una amplia variedad de razas, y éstas no se distribuían homogéneamente en la Comunidad de Madrid, considerándose la raza una variable dependiente de la zona, por lo que es difícil considerar la asociación de la raza sin tener en cuenta la zona donde se encuentra la granja de procedencia de los animales. Esta situación no resulta sorprendente, teniendo en cuenta las diferentes características propias de cada raza, que hacen que sean más adecuadas para una zona u otra dependiendo de su rusticidad, aptitud, temperamento u otras cualidades. En

concreto, en nuestro estudio, no se encontraron animales de las razas frisona, lidia, charolés y rubia gallega en la zona de montaña (M), lo que es achacable al manejo propio de estos pastos, localizados a una altitud considerable para la región en la que nos encontramos y con difícil acceso en muchas ocasiones. Así, las vacas frisonas eran las únicas de aptitud lechera del estudio, por lo que mantenerlas en zonas que dificultasen su ordeño no habría resultado práctico, mientras que para el ganado bravo, por sus características físicas y temperamentales, resulta más adecuada la cría en zonas de dehesa. Por el contrario, razas de aptitud cárnica consideradas por lo general más rústicas (avileña-negra ibérica, rubia gallega y rubia de Aquitania) no fueron encontradas en la zona de veranos cálidos (C).

Por su parte, la mayoría de los animales del estudio eran hembras, con tan solo 28 machos en el total de 496 animales incluidos. Una vez más, este hecho no es de extrañar, debido a las características propias de la cría con fines productivos de esta especie, donde se suele tener uno o dos sementales dependiendo del tamaño de la granja, y teniendo en cuenta el empleo cada vez más extendido de técnicas de reproducción artificial en las ganaderías, principalmente en las granjas con ganado de la raza frisona. En este caso también se determinó que el sexo era una variable dependiente de la zona, con la mayoría de los machos procedentes de granjas localizadas en la zona de veranos frescos (F).

Una característica de la selección de los animales a incluir en el estudio que debe ser tomada en cuenta es que en cada granja se buscó recoger muestras y datos epidemiológicos del 25% del censo, realizando la selección de manera aleatoria. No obstante, dicha selección se realizó en la mayoría de las ocasiones de entre los animales que eran sometidos al saneamiento ganadero frente a enfermedades de control oficial, que es realizado en todos los animales mayores de un año. Esta maniobra favorece el bienestar animal, al reducir la realización de procedimientos, aprovechando tanto el manejo como la propia extracción sanguínea obligatoria realizada con un fin diferente al investigador. No obstante, se introduce un sesgo en la selección de la muestra que debe ser considerado, al haber conducido a la inclusión de un número bajo de terneros en el estudio (un total de 15 animales menores de un año de los 493 de los que se conoce la edad). Los adultos de entre tres y ocho años fueron el grupo más numeroso, con casi la mitad de la muestra del estudio. La edad de los animales resultó ser una variable dependiente de la raza y de la zona de procedencia.

Tal y como se ha indicado previamente, debido a la realización de la toma de muestras gracias a la colaboración de los equipos veterinarios de la zona y

aprovechando los saneamientos ganaderos, la toma de muestras fue realizada entre los meses de abril y octubre de 2015, siendo muestreada cada granja en una única ocasión. Dado que los agentes estudiados son transmitidos por garrapatas y los ciclos biológicos de éstas se encuentran muy influenciados por las condiciones climáticas y, por tanto, por la estación del año, algunas de las diferencias de prevalencias entre granjas podrían estar relacionadas con el momento de la toma de muestras, tal y como se discutirá en cada caso. No obstante, se trata de agentes que causan infecciones consideradas, por lo general, de media o larga duración (Figuerola y col., 1992, Almería y col., 2001, Kocan, de la Fuente y col., 2010), sin variaciones significativas en los niveles de prevalencia en función del mes de recogida, tal y como describieron Almería y colaboradores en 2001 y 2002 en vacas de Menorca en las que se evaluó la infección por *Theileria annulata*, *Theileria buffeli*, *Babesia bigemina* y *Babesia bovis*.

En cuanto a características del sistema productivo de las granjas, debe tenerse en cuenta que en la zona de montaña (M) la densidad media de los animales de las granjas es menor que la registrada en las zonas con veranos cálidos y frescos. Además, cabe destacar que cerca de un tercio de las granjas (con el 29,91% de los animales) hacían un uso compartido de pastos, lo que conlleva un contacto con animales de otras granjas que podrían someter a los bovinos a prácticas diferentes a las reflejadas en las encuestas para las que sí fueron incluidas en este trabajo. El uso de los pastos comunales hace referencia al reparto de las hectáreas de uso público entre los usuarios ganaderos en función de la carga ganadera, donde pueden encontrarse varias ganaderías al mismo tiempo (Ruiz y col., 2017). La mitad de las diez explotaciones que compartían pastos se encontraban en la zona de clima mediterráneo continentalizado con veranos frescos (F), que comprende municipios como Pedrezuela, Becerril de la Sierra, Gascones, Collado Villalba y Cabanillas de la Sierra, mientras que la otra mitad pertenecían al clima de montaña (M), con los municipios de Somosierra, Los Molinos, Cercedilla y Prádena del Rincón, en los que es muy frecuente este manejo.

Por otra parte, el contacto con fauna silvestre fue frecuentemente descrito por parte de ganaderos y veterinarios, lo que puede influir en la presencia de enfermedades en las ganaderías, no solo las transmitidas por garrapatas u otros vectores, sino también otras, algunas tan importantes como puede ser la tuberculosis, para la que se ha descrito un papel fundamental como reservorio para el jabalí (Gortázar y col., 2008, Gortázar y col., 2017).

Todos los ganaderos consultados coincidieron en manifestar la presencia de garrapatas en sus explotaciones, empleando tratamientos antiparasitarios en el



87,83% de los animales. Sin embargo, al evaluar la frecuencia de desparasitación empleada en cada granja, se observa que ésta se ve influenciada por la zona en la que se encuentre, con menor frecuencia de desparasitación, de forma general, en la zona de veranos cálidos (C). El control de las garrapatas se basa principalmente en el uso de acaricidas convencionales y lactonas macrocíclicas (George y col., 2004, Rodríguez-Vivas y col., 2018), lo que ha sido corroborado en este trabajo. Sin embargo, el uso intensivo de estos compuestos ha dado como resultado poblaciones de garrapatas resistentes (George y col., 2004). Las recomendaciones en el uso de antiparasitarios son rotación de fármacos con diferentes mecanismos de acción, combinación de acaricidas y formulaciones sinérgicas, correcta dosificación según el cálculo del peso corporal y aplicación en el momento adecuado, limitando de esta manera su uso continuado. Los fármacos utilizados principalmente son organoclorados, piretroides, organofosforados, amidinas, fenilpirazoles, reguladores de crecimiento de insectos y lactonas macrocíclicas (Taylor 2001, Rodríguez-Vivas y col., 2018).

Por otra parte, si bien los ganaderos y veterinarios no señalaron la presencia de signos clínicos en los bovinos del estudio, algunos signos podrían haber pasado desapercibidos, teniendo en cuenta que muchos de los animales únicamente eran visitados en los momentos en los que se realizan tratamientos a toda la explotación, como desparasitaciones o vacunaciones, épocas de suplementación alimentaria o de paridera, y no era realizada exploración clínica alguna, salvo la reproductiva en las granjas en las que se hacía control reproductivo.

Finalmente, en relación a la analítica sanguínea realizada a los animales del estudio, ésta mostró por lo general valores medios dentro del intervalo de referencia, salvo en el caso de las enzimas hepáticas AST y ALT, que sobrepasaron ligeramente los límites superiores empleados. En este sentido, debe tenerse en cuenta que la interpretación de los valores de la analítica sanguínea debe realizarse siempre considerando todas aquellas variables que pueden influir en ellos, tales como la edad, el sexo, la raza, el hábitat, la aptitud y el tiempo transcurrido desde el parto (Stojević y col., 2005, Mohri y col., 2007, Moretti y col., 2017). Así, precisamente para los valores de AST Moretti y colaboradores describieron una variación entre los tres y los 30 días postparto en vacas frisonas, con intervalos de referencia fijados en 58,8-150,5 U/l y 52,3-111,8 U/l, respectivamente, superiores a los valores empleados en este estudio (48-100 U/l), descritos por Meyer y colaboradores (2004). La variabilidad de características de bovinos de este estudio, al igual que en la clínica rutinaria, hace que el uso de unos valores de referencia específicos para cada raza, edad o momento productivo tenga unas limitaciones prácticas importantes, haciéndose necesario

considerar todas las variables prácticamente en cada caso. Asimismo, debe tenerse en cuenta que la toma de muestras en este estudio fue llevada a cabo en muchas ocasiones a gran distancia del laboratorio de procesamiento, por lo que el suero pudo permanecer en algunos casos unas horas en contacto con el coágulo y algunas muestras sufrieron hemólisis. Este hecho podría justificar el que el valor de la AST se encuentre en algunos casos falsamente aumentado por la liberación de esta enzima desde los eritrocitos lisados (Russell y Roussel, 2007).

## 6.2. *Anaplasma phagocytophilum*

En nuestro estudio, se ha obtenido amplificación de ADN de *A. phagocytophilum* mediante la PCR empleada en nueve bovinos de los 496 muestreados, lo que supone una prevalencia del 1,81%. El resultado obtenido no resulta sorprendente, teniendo en cuenta que la garrapata vector en Europa es *Ixodes ricinus*, que se caracteriza por asociarse con ambientes húmedos y fríos como los bosques (Estrada-Peña y col., 2004) y se distribuye en nuestro país predominantemente en el norte de España (Barandika y col., 2011), tal y como se abordará a continuación, en relación al momento de recogida de las muestras. Así, la prevalencia en la Comunidad de Madrid, menor al 2%, sería comparable a la detectada en Sicilia, donde las prevalencias iban de 0% al 2,9% en función de la provincia (Torina, Alessandra y col., 2008). Estos datos se encuentran muy por debajo de las prevalencias descritas en otros países europeos situados más al norte, como Alemania (27,6%, 16/58) o Francia (20%, 4/20) (Laloy y col., 2009, Silaghi, Hamel y col., 2018). Mientras, en España se han descrito prevalencias muy variables en diferentes regiones del país. En Galicia se ha descrito una seroprevalencia en vacuno del 3,07% (14/456), principalmente hallada en la provincia de Pontevedra (Amusategui y col., 2006), y mediante estudios moleculares se han determinado prevalencias del 0% en Cádiz, donde se muestrearon 81 animales, que también fueron seronegativos, del 13% (20/157) en muestras de ganado vacuno recogidas en Castilla-La Mancha y Sicilia, y del 19% (20/107) en tres granjas de la provincia de Ciudad Real con ganado principalmente de raza limusín y algunos animales cruzados de charolés y retinta (de la Fuente, Naranjo y col., 2005, Naranjo y col., 2006, de la Fuente y col., 2008).

Concretamente, los animales en cuyas muestras sanguíneas se detectó ADN de este agente eran una hembra de la raza rubia de Aquitania que pertenecía a la granja nº 24, localizada en el municipio madrileño de Los Molinos, y el resto de animales pertenecían a la granja nº 28, de Prádena del Rincón, eran todas hembras, cinco de la raza conjunto mestizo, dos de la raza parda y una parda de la montaña. Esta granja de

Prádena fue incluida en un estudio previo a esta tesis doctoral realizado en el año 2013 en el que se obtuvo amplificación de ADN de *A. phagocytophilum* en un único bovino de los 128 muestreados, un ternero menor de un año de raza conjunto mestizo nacido en la explotación (Calleja-Bueno, 2013). Cinco de los ocho animales positivos a *A. phagocytophilum* de Prádena del Rincón se encontraban en la explotación en aquel estudio previo, y tres de estos cinco animales se muestrearon, pero no se obtuvo amplificación de ADN de *A. phagocytophilum* mediante esta misma PCR. El animal que fue positivo en 2013 no se encontraba actualmente en la granja, ya que, al ser un macho, se cebó para posteriormente ir al matadero. Aquel animal no presentó signos clínicos, al igual que los animales de este estudio tampoco mostraron signos característicos de esta enfermedad (tales como fiebre, anorexia o edema en las extremidades inferiores con marcha rígida) (Pusterla y Braun, 1997). Sin embargo, por lo general se considera que esta especie de anaplasma es capaz de producir enfermedad grave que puede llegar a ser mortal cuando se complica con otras infecciones como resultado de la inmunosupresión. La ausencia de signos clínicos en los animales positivos a *A. phagocytophilum*, así como el que no se hayan registrado casos clínicos previos en las granjas, puede deberse a que los animales que han pastado durante más de un período de pastoreo en zonas endémicas no suelen mostrar signos o estos son muy leves, habiéndose sugerido que la inmunidad adquirida es suficiente para prevenir los signos clínicos, aunque los animales pueden volver a infectarse (Pusterla y col., 1998). Asimismo y de forma relacionada, se ha descrito que los animales jóvenes padecen una enfermedad más leve que los adultos, siempre que no se produzca una infección secundaria. En este estudio no hubo asociación estadística entre la infección por *A. phagocytophilum* y la edad, perteneciendo los animales en los que se detectó a los grupos de jóvenes, adultos y geriátricos.

Las dos granjas en las que se detectó el agente se situaban en la zona de montaña, a más de 1.000 metros de altitud, con un clima de montaña que se caracteriza por tener en general una temperatura más baja y una humedad relativa mayor que otras zonas de la Comunidad de Madrid. Tal y como se mostró en el árbol de decisiones incluido en el apartado de resultados, la zona y la humedad relativa se relacionan estrechamente con la detección de *A. phagocytophilum* en el vacuno de la Comunidad de Madrid. Estos datos concuerdan con el hábitat del vector principal, que se restringe a las áreas más frías y más húmedas (Estrada-Peña y col., 2004, Barandika y col., 2011). En concreto, estas muestras se tomaron en los meses de septiembre y octubre, coincidiendo con la época de actividad de los adultos de *I. ricinus*, mientras que están activas las larvas y las ninfas en primavera y en verano (Estrada-Peña y col., 2004). En este estudio, se confirmó que la detección de garrapatas en los animales de la granja

durante la recogida de muestras sanguíneas era un factor de riesgo para la detección de *A. phagocytophilum*.

En la Comunidad de Madrid la distribución del vector principal es escasa, con una prevalencia descrita en la bibliografía del 0,5 al 2,3% (Toledo y col., 2009, Colmenero, 2015). Sin embargo, *A. phagocytophilum* parece que puede ser transmitido por otras especies de garrapatas, entre las que se encuentran géneros como *Dermacentor*, *Hyalomma*, *Amblyomma*, *Haemaphysalis* o *Rhipicephalus* (de la Fuente, Estrada-Pena y col., 2016). En este sentido, en un estudio publicado en 2009 no se encontraron especímenes de *I. ricinus* positivos a este agente en Madrid, sino que se detectó ADN de *A. phagocytophilum* en *H. lusitanicum*, *D. marginatus*, *R. bursa* y *R. pusillus*, con una prevalencia del 2,2% (Toledo y col., 2009). Concretamente, cinco de estas garrapatas positivas fueron recogidas de ganado bovino en Cercedilla, y se concluyó en este estudio que *A. phagocytophilum* es común en la zona centro de España y está presente en todas las estaciones (Toledo, 2007). En otras regiones de la zona centro del país también se ha descrito la presencia de *A. phagocytophilum* en garrapatas. Concretamente en Castilla-La Mancha se ha descrito una prevalencia del 5,7% de *A. phagocytophilum* en *H. marginatum*, *D. marginatus* y *R. bursa* recogidas de ciervos y jabalíes (de la Fuente, Naranjo y col., 2004), mientras que en otro estudio realizado en la provincia de Soria el 3,8% de las garrapatas de las especies *D. marginatus*, *I. ricinus*, *H. punctata* y *R. bursa* recogidas de personas, presentaban infección por *A. phagocytophilum* (Merino y col., 2005). En La Rioja, en *I. frontalis* e *I. ricinus* recogidas de aves, así como en *H. punctata* recolectadas del ganado, se halló una prevalencia de *A. phagocytophilum* del 1,7% (Palomar y col., 2015). Por tanto, *A. phagocytophilum* se encuentra circulando en una amplia variedad de especies de garrapatas, recogidas alimentándose de la fauna silvestre o en el ganado.

En este sentido, la amplificación de ADN de *A. phagocytophilum* en las muestras sanguíneas de los bovinos de este estudio se asoció estadísticamente con la presencia de fauna silvestre en contacto con ellos. En concreto, en ambas granjas se encontraban habitualmente carnívoros silvestres (zorros, tejones y lobos), rumiantes silvestres (corzos y cabras montesas) y aves rapaces (buitres), cuya presencia fue considerada un factor de riesgo para la infección por este agente en los bovinos del estudio. El clima y la abundancia de hospedadores silvestres y domésticos permiten no solo el mantenimiento de garrapatas en el medio ambiente (Barandika y col., 2006) sino que también pueden actuar como reservorios de *A. phagocytophilum*. Los reservorios no han sido identificados claramente, aunque varios estudios sugieren que el ciervo rojo (*Cervus elaphus*) podría ser el reservorio para las variantes que afectan a los rumiantes

domésticos, al mantenerse la infección hasta tres meses de forma subclínica. Igualmente, las ovejas podrían también ser reservorios de esta variante, al mantener la infección durante al menos un año (Stuen y col., 2010, Thomas y col., 2012). Por su parte, el corzo (*Capreolus capreolus*), que parece ser un importante contribuyente en la prevalencia de *A. phagocytophilum* en Europa, podría estar involucrado en otro ciclo epidemiológico, manteniendo sus propias variantes específicas, ya que parece poco probable que los corzos sean reservorios de la variante que afecta a humanos, caballos y mascotas ni de la variante relacionada con los rumiantes domésticos (Alberdi y col., 2000, Stuen y col., 2001, Silaghi y col., 2011, Dugat, Thibaud y col., 2014, Silaghi y col., 2018). Diferentes estudios realizados en nuestro país han identificado mediante técnicas moleculares *A. phagocytophilum* en cérvidos, como el ciervo, el corzo y el gamo, y en diferentes especies de aves (de la Fuente, Naranjo y col., 2005, Naranjo y col., 2006, de la Fuente y col., 2008, Portillo y col., 2011, García-Pérez y col., 2016). Además, curiosamente en la tesina de Colmenero, el 87,5% de todas las garrapatas *I. ricinus* recogidas en Madrid se encontraban sobre corzos (Colmenero, 2015). Todo esto nos hace sospechar que estos animales silvestres podrían estar involucrados en el mantenimiento de este agente en la Comunidad de Madrid, actuando como reservorios. Sin embargo, se necesitan más investigaciones para evaluar el impacto de *A. phagocytophilum* en la vida silvestre y el riesgo de transmisión a los animales domésticos, como sugieren algunos autores (de la Fuente y col., 2008, García-Pérez y col., 2016). En el caso de los carnívoros silvestres, estuvo ausente este agente en zorros, lobos, osos y tejones en un estudio realizado en el norte de España (García-Pérez y col., 2016), aunque en otro estudio, en Italia, se determinó una prevalencia del 16,6% de *A. phagocytophilum* en zorros (Ebani y col., 2017). Por otro lado, el papel de los jabalíes (*Sus scrofa*) como reservorio es controvertido por su capacidad de controlar la infección (Galindo y col., 2012), y en nuestro estudio no se ha encontrado asociación estadística entre su presencia y la detección de *A. phagocytophilum* en el vacuno. Asimismo, el movimiento de los animales silvestres o de las garrapatas infectadas en mamíferos o aves migratorias puede diseminar la bacteria. Así, se ha descrito que las aves migratorias podrían ser importantes en la dispersión de garrapatas en largas distancias (Bjöersdorff y col., 2001, Stuen 2007, Hildebrandt y col., 2010, Palomar y col., 2012) y también pueden tener un papel importante en el mantenimiento de la infección en determinadas zonas. En un estudio llevado a cabo en Ciudad Real, se determinó una prevalencia del 22% (10/46) en 18 especies de aves silvestres (de la Fuente, Naranjo y col., 2005).

Además, los animales de nuestro estudio estaban en contacto con otros animales domésticos, concretamente con caballos, clásicamente asociados con la

infección por *A. phagocytophilum* (Dumler y col., 2001). En este estudio no fue posible tomar muestras de otros animales de las granjas, si bien sería interesante completar este trabajo con una evaluación de la presencia de *A. phagocytophilum* en otros animales del entorno o, incluso, en sus cuidadores, dado el amplio rango de hospedadores de esta especie rickettsial.

Las dos granjas en las que se detectó ADN de este agente compartían pastos con otras ganaderías de vacuno en extensivo y, además, introducían bovinos de otras ganaderías mediante la compra de animales de zonas donde este agente pudiera estar presente, como del norte de España, donde el vector principal es más abundante. En concreto, en Prádena del Rincón introducen animales de las razas parda y parda de montaña de la zona de Huesca y, en el caso de la granja ubicada en Los Molinos, con rubia de Aquitania, es frecuente la compra de reposición y de sementales de otra granja de la Comunidad de Madrid que adquiere animales de Francia. Así, es posible que la presencia de *A. phagocytophilum* en las granjas del estudio se deba a la introducción de animales procedentes de zonas con mayores prevalencias de este agente, teniendo en cuenta que se han descrito prevalencias del 20% en la zona de la Bretaña francesa (Laloy y col., 2009). En Francia se han realizado pocos estudios de prevalencia a gran escala en regiones concretas (Dugat, Leblond y col., 2017), sin embargo se diagnostican frecuentemente casos clínicos y abortos causados por este agente (Chastagner y col., 2014, Dugat, Haciane y col., 2017). Cabe destacar que en la zona de Gascuña, en el suroeste de Francia, se halló una prevalencia del 1,9% de *A. phagocytophilum* en garrapatas *I. ricinus* recogidas del ambiente y del 76% en los corzos muestreados (Chastagner y col., 2017). No obstante, la falta de datos de las ganaderías de origen no permite confirmar ni descartar esta posibilidad.

En relación a los valores de la analítica sanguínea, a pesar de que la leucopenia es el hallazgo laboratorial más comúnmente relacionado con la infección por *A. phagocytophilum*, ninguno de los bovinos de este estudio presentó recuentos de leucocitos por debajo del rango de referencia para la especie. Por el contrario, uno de los nueve animales con infección por *A. phagocytophilum* presentaba leucocitosis por linfocitosis, hallazgo que no se asocia frecuentemente a esta infección, aunque en ocasiones se ha relacionado con el desarrollo de complicaciones respiratorias (Juste y col., 1989). La imposibilidad de completar la toma de muestras sanguíneas con la realización de una exploración física completa, debido a la inclusión de los animales durante el saneamiento ganadero, tal y como se ha descrito previamente en esta memoria de tesis doctoral, hace imposible conocer si este animal mostraba alteraciones en la auscultación pulmonar o en otros aspectos de dicha exploración.



Otro hallazgo de laboratorio descrito frecuentemente es la presencia de anemia en los animales con infección por *A. phagocytophilum* (Purnell y col., 1977, Pusterla, Huder y col., 1997). En este sentido, uno de los bovinos positivos a la PCR empleada en este estudio mostraba una anemia leve, con  $4,33 \times 10^6$  eritrocitos/ $\mu\text{l}$ . No obstante, los ganaderos no describieron la presencia de signos clínicos ni en este ni en ningún otro de los bovinos del estudio.

En cuanto a la bioquímica sanguínea, si bien no es una alteración frecuente en los bovinos con infección por *A. phagocytophilum*, no resulta sorprendente que cinco de los nueve animales de este estudio en cuyas muestras sanguíneas se detectó ADN de este agente presentasen hiperproteinemia, ya que esta alteración se observa frecuentemente en situaciones de estimulación antigénica crónica (Russell y Roussel, 2007, Abutarbush, 2015). Los valores medios de AST se mantuvieron dentro de los rangos normales en los estudios donde se incluyó este parámetro. Sin embargo, cabe destacar que los valores máximos de ALT encontrados en uno de estos estudios llegaron a alcanzar valores de 108,3 a 146,9 U/l (Pusterla, Huder y col., 1997, Silaghi y col., 2018). Además, en humanos y cabras con ehrlichiosis granulocítica se han observado aumentos en las actividades de las enzimas hepáticas, siendo el resultado de un deterioro transitorio de la función hepática (Lepidi y col., 2000, Giadinis y col., 2011).

La identificación de este patógeno en garrapatas, en animales silvestres y en animales domésticos sugiere un incremento del riesgo de *A. phagocytophilum* en la zona centro de España. Concretamente, con nuestro estudio, hemos comprobado por métodos moleculares la presencia de este agente como causa de infección en bovinos de la Comunidad de Madrid. La importancia de este patógeno, responsable de la anaplasmosis granulocítica en diferentes especies animales y en el hombre, hace necesario realizar más investigaciones en esta zona para determinar su importancia y evolución.

### 6.3. *Anaplasma marginale*

A pesar de que generalmente se considera que la mayor parte de los casos de anaplasmosis en el bovino de nuestro país se producen en el sur de la península ibérica y en Extremadura (Sevilla y col., 2002, Hurtado y Serrano, 2013) y aunque los veterinarios clínicos de la zona centro de España consideran de forma general que las enfermedades de transmisión vectorial de mayor importancia para el ganado vacuno de la zona son las piroplasmosis, en este estudio se ha obtenido una alta tasa de prevalencia molecular de *A. marginale* en la Comunidad de Madrid, con amplificación

de ADN con la PCR empleada en 149 de los 496 bovinos incluidos en el estudio, lo que supone una prevalencia del 30,04%. Concretamente en 21 de las 34 granjas muestreadas (61,76%) hay presencia de este agente, con prevalencias que van desde el 7,14% hasta el 85%, con seis granjas con valores de prevalencias iguales o superiores al 70%. En base a la bibliografía consultada, se desconoce la situación en el ganado vacuno de la Comunidad de Madrid. Sin embargo, en nuestro país encontramos algunos estudios que concuerdan con esta alta prevalencia, como las prevalencias descritas en Cádiz, en ganado en extensivo localizado en el Parque Natural de “Los Alcornocales”, donde predomina un clima mediterráneo y se ha descrito una prevalencia del 36% (29/81, de la Fuente y col., 2008), o en un estudio realizado en Castilla-La Mancha y Sicilia, con una prevalencia del 40% (126/317, Naranjo y col., 2006). Nuestra tasa se encuentra por encima del 11,3% (9/80) que se encontró en un estudio previo a esta tesis realizado en tres granjas pertenecientes a los municipios de Moralarzal, Pedrezuela y Prádena del Rincón en Madrid con animales en extensivo de la raza conjunto mestizo en su mayoría (Calleja-Bueno, 2013), del 20% (21/107) encontrado en Ciudad Real en ganado de carne de raza limusín y cruzados de charolés y retinta, y del 15,8% (32/202) descrito en Italia en muestras de diferentes regiones remitidas al centro nacional de referencia (de la Fuente, Naranjo y col., 2005, Torina y Caracappa, 2007). Las diferentes tasas de prevalencia pueden deberse a diferencias en las zonas geográficas y climáticas, tal y como describieron Belkahia y colaboradores en un estudio realizado en el norte de Túnez en el que hallaron una prevalencia de 25,4% (59/232) en ganado vacuno de dos zonas climáticas distintas, encontrando mayor prevalencia en la zona con mayor humedad (Belkahia y col., 2015) lo que relacionaron con variaciones en la distribución de los vectores. También podría relacionarse con las características de los bovinos muestreados y de los sistemas de manejo empleados, así como a la propia técnica de diagnóstico o la diana utilizada en cada caso. En este sentido, el uso del gen *msp1 $\alpha$*  en el diagnóstico molecular es un marcador genético estable que se conserva durante las fases aguda y crónica persistente de la infección por *A. marginale* en el ganado, con la ventaja de no encontrarse en otras especies de anaplasma (de la Fuente, Lew y col., 2005, Cabezas-Cruz y col., 2013). No obstante, podría ser útil realizar nuevos estudios empleando PCR en tiempo real, que permitiría valorar no solo la presencia del agente, sino también cuantificar la carga bacteriana en los animales (Carelli y col., 2007). El diagnóstico empleando frotis sanguíneo puede ser útil en la infección aguda junto a los signos clínicos de la enfermedad, pero no resulta adecuado para valorar infecciones crónicas con baja carga parasitaria. Además, hay que tener en cuenta la dificultad de diferenciar los cuerpos de inclusión intraeritrocitarios del punteado basófilo, de los cuerpos de Howell-Jolly, así como de otras partículas con forma parecida en los eritrocitos, sobre todo si no se dispone de la suficiente



experiencia. Por otro lado, los métodos serológicos tampoco resultan adecuados, por las reacciones cruzadas con otras anaplasmosis y por la situación endémica que encontramos, en la que podría resultar más conveniente valorar infección en lugar de exposición al agente (Aubry y Geale, 2011, Kocan y col., 2015).

En relación con los datos de los animales de esta tesis doctoral, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en función de la raza. En concreto la raza frisona presentó menor amplificación de ADN de *A. marginale* (con un único animal positivo a la PCR realizada de los 76 frisonos que fueron incluidos en el estudio) que el resto de las razas de la muestra, algo que también ocurrió en un estudio realizado en Túnez, en el que los animales de raza frisona presentaban menores tasas de infección por *A. marginale* en comparación con otras razas y sus cruces (Belkahia y col., 2015). En este sentido, un estudio de seroprevalencia realizado en Pakistán mostró una mayor prevalencia en los mestizos que en los animales de raza pura (Atif y col., 2013), mostrando nuestros resultados de este trabajo de investigación que la tasa de infección de estos animales pertenecientes al grupo de raza “conjunto mestizo” fue de casi el 40%, superior a la prevalencia media del total de la muestra del estudio. No obstante, debe destacarse que los mayores porcentajes de prevalencia de *A. marginale* de este trabajo de tesis doctoral se obtuvieron para las razas rubia gallega (con un 79,17%), charolés (65%), limusín (50%) y el grupo de “otras razas”, que incluye las razas asturiana de la montaña, asturiana de los valles, berrenda, bruna, fleckvieh, parda y parda de la montaña (48%), mientras que no se detectó ADN de este agente en ninguno de los 26 bovinos de raza de lidia incluidos en el estudio. Debe tenerse en cuenta que en otros estudios disponibles en la bibliografía la raza no tuvo un efecto significativo en la tasa de prevalencia de este patógeno (Ait Hamou y col., 2012, Jaimes-Dueñez y col., 2017) y que, tal y como se ha discutido previamente, en este estudio se ha comprobado una asociación estadísticamente significativa entre la zona de procedencia de los animales y la raza, por lo que la asociación entre la positividad a la PCR de *A. marginale* y la raza podría estar relacionada con la distribución de las razas en las diferentes regiones climáticas evaluadas.

En cuanto a la edad de los animales, se observó que el grupo de edad estaba asociado estadísticamente con la amplificación de ADN de *A. marginale*. El ganado vacuno puede contraer la enfermedad a cualquier edad y, sin embargo, en la bibliografía se ha descrito que los animales menores de seis meses raramente sufren la infección por *A. marginale* y, si lo hacen, no suelen mostrar signos clínicos, ya que parecen presentar una resistencia natural (Richey y Palmer, 1990, Aubry y Geale, 2011). Esta resistencia posiblemente es debida a que la respuesta inmunitaria celular

es mayor, por la competencia del timo, a la inmunidad pasiva aportada por el calostro, al sistema hematopoyético, más activo que en el adulto, y al papel más activo de la hemoglobina fetal. Todos estos factores parecen colaborar para ofrecer una resistencia a la anaplasmosis para los bovinos hasta cerca de los nueve meses de edad (Corona y col., 2005, Aubry y Geale, 2011). Estas descripciones parecen apoyar los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral, en la que se obtuvo la menor prevalencia en la amplificación de ADN de *A. marginale* a partir de las muestras de sangre de terneros menores de 1 año. Concretamente, la edad media de los animales incluidos en este grupo fue de siete meses. No obstante, en la interpretación de este resultado debe tenerse en cuenta el bajo número de animales incluidos en el grupo de los terneros debido, tal y como se ha comentado previamente en esta memoria, a la toma de muestras aprovechando el manejo durante el saneamiento ganadero.

Como se ha comentado anteriormente, todos los grupos de edad son susceptibles, pero la prevalencia parece aumentar con la edad (Atif, 2015), lo que concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo, obteniéndose la mayor prevalencia de *A. marginale* en los animales mayores de ocho años. Esta mayor prevalencia a mayor edad es esperable en aquellas enfermedades transmitidas por vectores, ya que a mayor edad, mayor probabilidad de exposición al vector portador del agente.

En este sentido, se ha descrito que el ganado entre seis meses y tres años comienza a incrementar el padecimiento de la enfermedad y ocurren más muertes con el avance de la edad, en muchos casos en animales de más de tres años (Corona y col., 2005). Sin embargo, teniendo en cuenta que los animales de este estudio no presentaban signos clínicos de enfermedad, estos resultados parecen sugerir la existencia en la zona de una estabilidad enzoótica.

Tal y como se ha descrito por diversos autores, en zonas endémicas de anaplasmosis causada por *A. marginale* es frecuente la presencia de un alto porcentaje de ganado infectado, con la rara ocurrencia de la enfermedad clínica (Richey y Palmer, 1990, Corona y col., 2005). Parece que esta relación se mantiene gracias a la primoinfección de los animales más jóvenes, en los que la enfermedad es menos frecuente y menos grave en caso de producirse, con el mantenimiento de una inmunidad pasiva que evitaría la enfermedad en los animales mayores, más susceptibles (Aubry y Geale, 2011). Así, una vez establecida, es mantenida en el ganado adulto mediante reinfecciones, sin signos clínicos (Corona y col., 2005). En estudios previos de seroprevalencia de *A. marginale*, esta aumenta con la edad, lo cual es

consistente con nuestros resultados (Urdaz-Rodríguez y col., 2009, Atif y col., 2013) y un estudio reciente de prevalencia molecular también halló un mayor riesgo en los animales adultos (Moumouni y col., 2018). Así, los animales permanecen infectados como portadores crónicos de por vida, tanto si desarrollan la enfermedad como si no lo hacen, con niveles bajos de rickettsemia que pueden variar de forma cíclica (Kocan, de la Fuente, Blouin y col., 2010, Aubry y Geale, 2011). Debe destacarse que la positividad a este agente en la muestra de estudio se asoció estadísticamente a la descripción de casos clínicos previos en la ganadería compatibles con enfermedades de transmisión vectorial en el bovino, con la presencia de signos como palidez de mucosas, fiebre, pérdida de peso o abortos.

Los animales con amplificación de ADN de *A. marginale* se encontraban preferentemente en las zonas de clima de montaña (zona M) y mediterráneo continentalizado con veranos frescos (zona F), con unas tasas de prevalencia del 32,58% y del 38,57%, respectivamente, mientras que la zona de clima mediterráneo continentalizado con veranos cálidos (C) mostraba una prevalencia de tan solo el 6,14%. Además, la altitud media y la humedad relativa en el momento del muestreo fueron superiores para los animales en cuyas muestras sanguíneas se detectó *A. marginale*, mientras que la temperatura fue inferior. La época del año en la que se observaron las mayores prevalencias fue el otoño (47,29%), encontrándose un incremento progresivo de la misma desde la primavera, si bien no se dispone de muestras recogidas en invierno. Los meses de mayor prevalencia fueron abril (40,38%) y octubre (58,6%), con prevalencias en torno al 13% y con poca variación durante el resto de los meses en los que se tomaron muestras. Este incremento progresivo de la prevalencia de *A. marginale* podría estar relacionado con la epidemiología del agente y su vector en la zona centro de España. Como se ha comentado en la revisión bibliográfica, en nuestro país se han descrito tres especies de garrapatas capaces de transmitir *A. marginale*: *Hyalomma marginatum*, *Dermacentor marginatus* y *Rhipicephalus bursa* (de la Fuente, Naranjo y col., 2004, de la Fuente, Naranjo y col., 2005). *D. marginatus* podría estar implicada en la transmisión biológica de *A. marginale* en la Comunidad de Madrid, ya que en estudios previos realizados en la zona centro se ha identificado como la segunda especie más prevalente y que predomina en los meses de otoño e invierno, aunque también permanece activa en los meses de marzo a junio (Toledo y col., 2009, Barandika y col., 2011). *D. marginatus* tiene más requerimientos termófilos que otras especies de garrapatas, encontrándose en las partes más frías y más húmedas de la región climática asociada con las montañas (Estrada-Peña y col., 2004). En el estudio previo a esta tesis se pudieron recoger algunos ejemplares de garrapatas en Prádena del Rincón, que fueron identificadas

como *Hyalomma marginatum* (Calleja-Bueno, 2013). *H. marginatum* se caracteriza por tener actividad de primavera a verano con actividad en otoño los estadios inmaduros, mientras que los adultos pueden mantenerse presentes todo el año en ciervos y jabalíes. Se ha descrito que es una especie abundante en la zona centro y sur de la península ibérica en áreas bioclimáticas mediterráneas (Olmeda, Sancho y col., 2002, Estrada-Peña y col., 2004, Ruiz-Fons y col., 2006), aunque no es muy frecuente concretamente en Madrid, donde Toledo y colaboradores (2009) encontraron una prevalencia de esta especie del 0,9%, principalmente alimentándose en ganado vacuno. Sin embargo, en Castilla-La Mancha se encontró una prevalencia del 22,3% de *H. marginatum* recogida de la vegetación (Fernández de Mera y col., 2013), siendo una especie muy comúnmente encontrada alimentándose en los ciervos y jabalíes en el centro y sur de España (63,7%) (Ruiz-Fons y col., 2006). Además, se ha hallado una prevalencia del 23 al 39% de *A. marginale* en *H. marginatum* recogidas de ciervos y jabalíes en Castilla-La Mancha y en Ciudad Real (de la Fuente, Naranjo y col., 2004, de la Fuente, Naranjo y col., 2005). Por otro lado, algunos autores han considerado a *R. bursa* como una especie responsable de la transmisión de *A. marginale* (Olmeda, Sancho y col., 2002, de la Fuente, Vicente y col., 2004). Esta especie parasita comúnmente al ganado de la región mediterránea y se encuentra en toda la península, con un periodo de actividad de otoño a invierno para las larvas y ninfas y de primavera a otoño para los adultos, con picos en junio y julio (Olmeda, Sancho y col., 2002, Estrada-Peña y col., 2004). La prevalencia de *R. bursa* en la Comunidad de Madrid representó el 4%, recogida de animales y vegetación (Toledo y col., 2009, Colmenero, 2015), mientras que en Castilla-La Mancha se ha encontrado una prevalencia del 17,6% en la vegetación (Fernández de Mera y col., 2013). Ruiz-Fons y colaboradores (2006) en un estudio de distribución geográfica y temporal de garrapatas recogidas de ciervos y jabalíes en toda España destacaron que esta especie se recogió en ambos hospedadores, manteniéndose todo el año pero en un patrón inverso a *H. marginatum*. Además, se ha amplificado ADN de *A. marginale* en garrapatas de la especie *R. bursa* recogidas de ciervos en Ciudad Real y Castilla-La Mancha (8 y 9%, respectivamente) (de la Fuente, Naranjo y col., 2004, de la Fuente, Naranjo y col., 2005).

Por otra parte, el uso de pastos compartidos puede ser considerado como un factor de riesgo para la infección del ganado con *A. marginale* en la Comunidad de Madrid, con una prevalencia del 55,71% en comparación con el 20,73% registrado en este estudio cuando no se comparten. Si bien este resultado debe ser interpretado con cautela, debido al diferente uso de este manejo entre las diferentes zonas climáticas y geográficas de la región, es posible que en este hecho participe no solo el posible paso de garrapatas de unos animales a otros, sino también la transmisión mecánica debida

a la presencia de otros insectos hematófagos (de la Fuente, García-García, Blouin, McEwen y col., 2001, Kocan, de la Fuente y col., 2004), dado que en Ciudad Real se ha detectado ADN de *A. marginale* en tábanos (de la Fuente, Naranjo y col., 2005).

Con respecto a los resultados de los tratamientos antiparasitarios empleados, curiosamente los animales de la Comunidad de Madrid que no se desparasitan no presentan amplificación de ADN de *A. marginale*. En concreto estos bóvidos pertenecen a dos granjas: una de ellas es la granja nº 8 situada en Guadarrama, en la zona de clima continentalizado con veranos frescos (F), con ganado de lidia, y la otra es la granja nº 18, en Rivas-Vaciamadrid, en la zona de clima continentalizado con veranos cálidos (C) con ganado frisón, raza que presenta la prevalencia más baja, junto a la raza de lidia, en la que no se ha detectado infección por *A. marginale*. Ambas explotaciones no comparten pastos con otras ganaderías y no han presentado casos previamente, dos variables que han resultado factores de riesgo para este agente en la presente tesis. Una vez explicado este hecho, cabe destacar que cuanto mayor es el número de desparasitaciones al año, más prevalencia encontramos en el ganado de Madrid, y que cuando se usan lactonas macrocíclicas, ya sean solas o en combinación con piretroides, también encontramos prevalencias superiores. Este hallazgo sugiere la necesidad de replantear los protocolos antiparasitarios que son utilizados en la actualidad. No obstante, es posible que precisamente las zonas en las que los ganaderos y veterinarios detectan una mayor presencia de garrapatas y en las que se hayan presentado casos clínicos previos de enfermedades transmitidas por garrapatas, se incida más en el empleo de tratamientos antiparasitarios, por lo que podría tratarse más de una consecuencia que de una causa de la mayor prevalencia de este agente. Asimismo, en estos datos también debe tenerse en cuenta la posible transmisión mecánica de *A. marginale* a través del empleo de fómites contaminados con sangre de animales infectados (Kocan, de la Fuente y col., 2004), ya que, aunque no se recomienda el uso repetitivo de agujas para inyectar al ganado, esta práctica es de uso frecuente en ganado en extensivo. La diseminación iatrogénica por material contaminado con sangre de animales infectados a no infectados puede representar un medio importante de transmisión de *A. marginale* dentro de los rebaños (Aubry y Geale, 2011). En un estudio se confirmó que *A. marginale* puede transmitirse mediante inyección intramuscular con una aguja contaminada, llegando a la conclusión de que esta vía de infección puede ser responsable de la transmisión horizontal (Reinbold y col., 2010a).

Por otra parte, la presencia de rumiantes silvestres y jabalíes parece suponer un factor de riesgo de infección por *A. marginale* en el vacuno de la Comunidad de Madrid. En este sentido, se ha demostrado que el ciervo ibérico (*Cervus elaphus hispanicus*) está

infectado de forma natural con *A. marginale* y, por lo tanto, puede servir como reservorio del patógeno (de la Fuente, Vicente y col., 2004). Concretamente se han visto infectados por *A. marginale* el 30% de los 20 ciervos muestreados en Ciudad Real (de la Fuente, Naranjo y col., 2005), algo que no ocurre en los corzos (*Capreolus capreolus*) estudiados en Cádiz (de la Fuente y col., 2008). En un estudio con muestras procedentes de Castilla-La Mancha y Sicilia la prevalencia en ciervos fue del 17% (1/6) (Naranjo y col., 2006).

Aunque el jabalí no es susceptible a la infección por *A. marginale* se considera que puede ser hospedador de las especies de garrapatas vectores de este agente, como se ha comprobado en los estudios realizados por de la Fuente y colaboradores (2004, 2005), algo que también podría ocurrir en el caso de las aves migratorias, siendo importantes en la dispersión de garrapatas en largas distancias (Bjöersdorff y col., 2001), aunque no se ha detectado ADN de *A. marginale* en 46 aves silvestres de 18 especies diferentes (de la Fuente, Naranjo y col., 2005). Por el contrario, en este trabajo de tesis doctoral se ha observado una menor prevalencia de infección por *A. marginale* en los bovinos que procedían de explotaciones con presencia de carnívoros silvestres y aves rapaces, así como de conejos y liebres y otros animales domésticos (caballos y perros).

Los valores medios de los parámetros de la analítica sanguínea realizada a los animales de este estudio se encontraron dentro de los rangos de referencia para la especie, lo que parece concordar con la ausencia de signos clínicos en el momento del muestreo. No obstante, cabe destacar que se ha encontrado un valor de CHCM estadísticamente inferior en los bovinos con infección por *A. marginale* del estudio. En este sentido, se ha descrito como una alteración frecuente de los bovinos con anaplasmosis el desarrollo de anemia regenerativa en la fase avanzada de la enfermedad (Sevilla y col., 2002), que podría caracterizarse por la presencia de hematíes hipocrómicos. Sin embargo, entre los 149 bovinos en los que se detectó *A. marginale*, únicamente una vaca presentó anemia, y se trataba precisamente de un animal coinfectado por *A. phagocytophilum*. Por otra parte, se observó un valor menor de plaquetas en los positivos, con trombocitopenia en 13 animales, si bien esta alteración no ha sido descrita en la bibliografía en relación con la infección por *A. marginale*. En cuanto al mayor recuento de eosinófilos hallado en los animales en los que se detectó ADN de *A. marginale*, junto con mayores valores medios de leucocitos y linfocitos (aunque de manera no significativa), es importante señalar que en la bibliografía se han descrito aumentos de los leucocitos después de la parasitemia



máxima, así como durante la recuperación, asociados con linfocitosis, así como con neutrofilia (Nazifi y col., 2012, Doyle y col., 2016).

En resumen, los resultados de este estudio sugieren que las infecciones por *A. marginale* en esta región del centro de España se mantienen entre bovinos y rumiantes silvestres biológicamente a través de garrapatas y posiblemente entre bovinos de forma mecánica, pudiendo mantener una prevalencia estable de infección endémica en la población bovina.

#### 6.4. *Anaplasma centrale*

Esta bacteria se encuentra ampliamente extendida en regiones tropicales y subtropicales desde Sudáfrica, donde se descubrió, al resto de África, Australia, el sur y el este de Asia y muchos países de América Latina, en parte por su uso como vacuna viva contra la anaplasmosis causada por *A. marginale* (Uilenberg, 1995).

La única identificación y caracterización filogenética de *A. centrale* en Europa se ha encontrado en Italia (Carelli y col., 2008). Sin embargo, en la zona del mediterráneo encontramos prevalencias en el ganado vacuno muy dispares. La tasa de prevalencia de *A. centrale* observada en Turquía, en un estudio realizado en 74 granjas al este del Mar Negro, es del 1% (4/398) (Aktas y col., 2011), menor que las prevalencias encontradas en el sur de Italia por Ceci y colaboradores en 2014 (13,8%, 207/1.500) y en ganado vacuno del norte de Túnez (15,1%, 35/232) (Belkahia y col., 2015). En Sicilia, durante un estudio llevado a cabo en 1999 en 187 vacas de leche, la prevalencia de *A. centrale* determinada por RLB fue del 7,5% en junio y del 20,5% en agosto, siendo esta la primera vez que se registraba este patógeno en Sicilia (Georges y col., 2001). Las prevalencias más altas se han encontrado en ganado al noreste de Argelia (42,2%, 71/180) (Rjeibi y col., 2018) y en el sur de Italia (39,2%, 20/51) (Carelli y col., 2007).

En España no se ha detectado *A. centrale* en ganado vacuno. Sin embargo, se ha identificado en fauna silvestre en el norte de nuestro país, coincidiendo con la zona de distribución de la especie de garrapata, *Haemaphysalis punctata*, que se cree responsable de su transmisión en Europa, ya que se amplificó ADN de este agente en dos garrapatas de esta especie recogidas alimentándose de una vaca y otra de la vegetación en La Rioja (Barandika y col., 2011, Palomar y col., 2015). Concretamente, en la fauna silvestre, se ha detectado ADN de *A. centrale* en un corzo y en un ciervo en un estudio realizado en Asturias y el País Vasco, mientras que en La Rioja, la prevalencia del agente fue del 33,3% (7/21) en ciervos (Portillo y col., 2011, Palomar y col., 2015, García-Pérez y col., 2016).

Dada la presencia de *A. centrale* en rumiantes silvestres de nuestro país y al haberse descrito que a menudo se presentan infecciones mixtas de *A. marginale* y *A. centrale* (Khumalo y col., 2016), se decidió incluir la PCR de *A. centrale* en la presente tesis. Su posible presencia en la zona podría justificar, al menos parcialmente, la ausencia de signos clínicos en los bovinos de este estudio y el limitado diagnóstico de anaplasmosis clínicas en la Comunidad de Madrid a pesar de la alta prevalencia de infección por *A. marginale* encontrada. Sin embargo, como se ha comentado anteriormente, no se detectó ADN de *A. centrale* en ninguna de las muestras sanguíneas del ganado bovino analizadas en esta tesis doctoral.

### 6.5. *Babesia bigemina*

En este estudio se ha encontrado una prevalencia molecular de *Babesia bigemina* en el ganado vacuno del 21,98%. Los 109 animales a partir de cuyas muestras sanguíneas fue posible amplificar ADN de este agente pertenecían a 20 de las 34 explotaciones muestreadas (58,82%) con prevalencias a nivel de granja que van desde el 10 al 70%. Esta prevalencia es superior a la descrita en otros países cercanos, como en Portugal, donde se determinó una prevalencia molecular del 7,8% (110/1.407) mediante RLB, siendo esta especie de babesia la más frecuente (Gomes y col., 2013), y en la cuenca del Mediterráneo, donde se ha descrito una prevalencia mediante RLB del 10,16% (19/187) en un estudio realizado en seis áreas de Sicilia, cinco de ellas en el norte y una en el sur (Georges y col., 2001), y del 11,2% (22/196) en un estudio realizado empleando PCR anidada en seis provincias de Turquía (Zhou y col., 2016). Asimismo, en relación a lo descrito en nuestro país, la tasa de prevalencia hallada en este estudio es muy superior a la descrita por García-Sanmartín y colaboradores (2006) en ganado vacuno de 77 granjas de la mitad norte de España y dos del sur, que describieron que siete de 263 animales muestreados presentaban infección, lo que supone una prevalencia del 2,7% (García-Sanmartín y col., 2006). De forma similar, en un estudio realizado en la zona de Toledo solo un animal de los 28 de raza charolés analizados presentó ADN de *B. bigemina*, mientras que en Cádiz ningún animal de los 17 cruzados de charolés y retinta presentaron amplificación de ADN de esta babesia (Gubbels y col., 1999). Se han realizado diferentes estudios en las islas Baleares, detectándose en Menorca prevalencias que varían entre el 6 y el 42,4%. Así, Almería y colaboradores analizaron 133 bóvidos con exposición a garrapatas de diferentes granjas, obteniendo una prevalencia del 6% mediante PCR convencional y mediante RLB (Almería y col., 2001, Almería y col., 2002), mientras que en otro estudio con 119 vacas de leche de 12 granjas en semiextensivo obtuvieron prevalencias que iban del 8,3 al 30% en cuatro de las 12 granjas que fueron positivas (Almería y col., 2009). Las



diferencias encontradas entre ambos estudios parecen venir dadas por el entorno donde los animales pastaban. En un estudio posterior en Menorca, donde se incluyen 33 animales de tres granjas (11 por granja) de ganado frisón con historia previa de piroplasmosis clínica, sin signos clínicos y con una edad comprendida entre nueve meses y 10 años, se obtuvo una prevalencia del 42,4% (14/33), siendo la especie de babesia más frecuente (Ros-García, García-Pérez y col., 2012). Por otra parte, en un estudio realizado en Extremadura en un total de 490 sueros en ganado de lidia analizados mediante IFI se obtuvo una seroprevalencia del 79,3% frente a *B. bigemina* (Habela y col., 2002). Al igual que para *A. marginale*, las diferentes prevalencias detectadas en los estudios publicados pueden venir dadas por las diferentes condiciones climáticas en diferentes zonas de España, que determinan la distribución del vector y, por lo tanto la incidencia de los agentes (García-Sanmartín y col., 2006). Asimismo, las diferentes características del ganado y su manejo o las técnicas empleadas para el diagnóstico, con diferentes sensibilidades y especificidades, y el que se evalúe infección o exposición al agente pueden encontrarse detrás de las diferencias descritas.

En cualquier caso, Habela y colaboradores resaltaron en una revisión publicada en 2002 que esta es una de las babesiosis más frecuentes del centro y sur peninsular y que, sin embargo, aún son muchos los datos de su epidemiología que se desconocen (Habela y col., 2002). Concretamente en la Comunidad de Madrid no se han realizado estudios de prevalencia para este agente y en la zona centro del país, estos estudios son escasos. Por lo tanto, se hace necesario realizar nuevos estudios que incluyan animales de diferentes regiones del país para tratar de clarificar la situación epidemiológica de *B. bigemina* en España.

En este estudio hemos encontrado diferencias estadísticamente significativas en la prevalencia de *B. bigemina* en función de la raza de los animales, siendo la raza charolés la que mayor prevalencia ha mostrado (con 11 animales positivos de los 20 de esta raza muestreados, 55%), seguida de la raza avileña-negra ibérica (30/76, 39,47%), rubia gallega (9/24, 37,5%) y limusín (6/22, 27,27%). En este sentido, debe recordarse que la raza de los animales se asoció estadísticamente con la zona donde se encontraban, por lo que estos resultados podrían estar influenciados, al menos parcialmente, por las características que determinan la distribución del vector, más que por la raza en sí misma. Sin embargo, llama la atención la ausencia de detección de este agente tanto en animales de raza de lidia como en la raza frisona, ya que esta última se ha descrito como una raza altamente susceptible a la babesiosis bovina cuando se encuentra en áreas endémicas (Guglielmone y col., 1992). En la bibliografía se

encuentran estudios que comparan la susceptibilidad a esta enfermedad de las especies *B. indicus* y *B. taurus* que muestran que *B. indicus* y los animales cruzados de *B. indicus* son significativamente más resistentes que los bóvidos de la especie *B. taurus*, señalando que la rusticidad de los primeros puede favorecer una mayor resistencia natural (Bock y col., 1997, Bock y col., 1999). Sin embargo, estos mismos autores recuerdan que también existe una susceptibilidad individual, que, junto con la variación de la patogenicidad de aislados de *B. bigemina*, podría ayudar a explicar la falta de consistencia en la literatura con respecto a la susceptibilidad de la raza o especie de bóvido a *B. bigemina* (Bock y col., 1997, Bock y col., 1999). No obstante, debe tenerse en cuenta que estos trabajos se refieren a la susceptibilidad de los animales para padecer la enfermedad clínica, y el infectarse con un determinado parásito transmitido por garrapatas probablemente no se deba al tipo de raza (Kolte y col., 2017). En este sentido, los animales de nuestro trabajo no mostraban signos clínicos en el momento del muestreo y, además, no se encontró una asociación estadística entre la descripción de casos clínicos previos compatibles con enfermedades vectoriales del bovino en la granja y la positividad a *B. bigemina*. Todo ello, unido a la alta prevalencia detectada, apoya la posible existencia de una estabilidad parásito-hospedador en la Comunidad de Madrid.

Otro resultado sorprendente que se refiere a los datos de la reseña de los animales que se asoció estadísticamente con la prevalencia de *B. bigemina* en este estudio es el sexo. En otros estudios, no se ha encontrado asociación entre el sexo de los animales y la infección por *B. bigemina* (Awad y col., 2011, Moumouni y col., 2018). En nuestros resultados encontramos que los machos presentan una prevalencia significativamente superior que las hembras, con 13 de 28 (46,43%) machos muestreados positivos a este agente y 96 de 468 (20,51%) hembras muestreadas positivas. Sin embargo, en este hallazgo puede influir la asociación estadística detectada entre positividad a *B. bigemina* y la edad de los animales, ya que los animales más jóvenes presentaron mayor prevalencia de *B. bigemina* en nuestro estudio, y los machos tenían una edad media de 2,7 años frente a los 5,7 años de media de las hembras.

En relación a la asociación estadística encontrada entre la edad y la positividad a *B. bigemina*, otros estudios también han descrito diferencias significativas relacionadas con la edad, presentando los animales jóvenes mayor prevalencia de *B. bigemina* (Smeenck y col., 2000, Simuunza y col., 2011, Moumouni y col., 2018). Los bovinos portadores infectados con *B. bigemina* son difíciles de detectar debido a la pequeña cantidad de parásitos existentes en la sangre periférica. La persistencia de la

infección por *B. bigemina* parece ser de corta duración (Pipano y col., 2002). Sin embargo, los animales son capaces de resistir el desafío con una cepa homóloga y, en algunos casos, incluso evitar el restablecimiento detectable de la infección (Callow, 1967, Bock y de Vos, 2001). En áreas endémicas, los terneros desarrollan inmunidad al infectarse de forma natural en una etapa temprana, cuando presentan resistencia natural a la enfermedad clínica (Latif y col., 1979), y posteriormente mantienen una baja parasitemia periférica que hace que sean capaces de evitar reinfecciones.

Las zonas donde se encuentran las mayores prevalencias de *B. bigemina* en nuestro estudio son las zonas de clima de montaña (zona M, con una prevalencia del 30,34%) y clima mediterráneo continentalizado con veranos frescos (zona F, 26,96%), caracterizadas por encontrarse a mayor altitud y con más humedad relativa media y menor temperatura media que la zona de clima mediterráneo continentalizado con veranos cálidos (zona C, con una prevalencia de 2,63%). Por tanto, no es de extrañar que la positividad a la PCR empleada en este trabajo para detectar ADN de *B. bigemina* se asociase con una mayor altitud, una menor temperatura media y mayor humedad relativa en el momento del muestreo y con el mes del año en el que se incluyeron los animales en el estudio. Concretamente, tal y como se describió en el apartado de resultados de esta memoria, el mes en el que se obtuvo la mayor prevalencia fue abril (con un 46,15% de prevalencia), seguido de octubre (28,03%), siendo este último mes en el que se obtuvo el mayor número de animales positivos a este agente. Todos estos resultados de forma global parecen mostrar una distribución climática y geográfica en la región de Madrid, lógica en el caso de agentes transmitidos por vectores artrópodos. Se ha sugerido que *R. bursa* es el principal vector de *B. bigemina* en España. Se trata de una especie que se halla prácticamente en todo el país, poco termofílica, que puede aparecer a más de 600 metros de altitud dentro de un hábitat húmedo adecuado y, además, es una de las especies del género *Rhipicephalus* más comunes en el ganado de la región mediterránea (Habela y col., 2002, Estrada-Peña y col., 2004). Los periodos de actividad de *R. bursa* son los meses de otoño para las formas inmaduras y la primavera-verano para los adultos, lo que coincide con los hallazgos de prevalencia de *B. bigemina* en el ganado vacuno de este trabajo (Habela y col., 2002, Barandika y col., 2011, Ros-García, García-Pérez y col., 2012). Como se ha comentado anteriormente en la discusión de *A. marginale*, la prevalencia de *R. bursa* en la Comunidad de Madrid está en torno al 4%. Concretamente, Toledo y colaboradores identifican, de un total de 1.480 garrapatas recogidas, 56 ejemplares de *R. bursa*, recogidas 40 de ellas alimentándose de animales (caballos, vacas y ovejas) y 16 de la vegetación (Toledo, 2007, Toledo y col., 2009). Mientras, en la tesina de Colmenero se describe una prevalencia del 4% en Madrid y del 50% en Cataluña (con una prevalencia conjunta del

16%, 223/1.361), recogidas la mayoría de cabras pirenaicas (86/223) y de jabalíes (80/223), así como de ciervos (18/223) y corzos (10/223) (Colmenero, 2015). Es una especie que puede estar presente en regiones más frías, con preferencia por un hábitat con arbustos y pastos, en general, sin cobertura arbórea (Barandika y col., 2011), que podría presentar mayores prevalencias según la zona concreta donde sea recogida, como vemos en un estudio llevado a cabo en 20 sitios de Castilla-La Mancha, donde se ha encontrado una prevalencia del 17,6% (26/148) en la vegetación (Fernández de Mera y col., 2013). Así, aunque la prevalencia de *R. bursa* en la zona centro pueda ser baja, este dato tiene importancia si tenemos en cuenta la transmisión transovárica de *B. bigemina*, que tiene especial transcendencia epidemiológica, al permitir que las propias garrapatas actúen como reservorio de este agente (Habela y col., 2002), a lo que se une que el ganado vacuno también es capaz de adoptar este papel de reservorio, con una frecuente persistencia de las infecciones (Bock y col., 2004). Todo ello podría explicar, al menos parcialmente, la prevalencia de *B. bigemina* del 21,98% detectada.

No obstante, en este estudio se ha observado que el hecho de encontrar garrapatas en el ganado de la granja en el momento del muestreo actuaba como un factor de riesgo para la detección de *B. bigemina*, con un 30,72% de prevalencia si se encontraban garrapatas y del 17,58% si no se encontraban. Al igual que para los agentes anteriores resultaría interesante completar este estudio con la identificación de las garrapatas presentes en cada granja, tanto en los animales como en el ambiente, y con la detección de *B. bigemina* en los propios vectores.

En relación con los tratamientos antiparasitarios, ocurre lo mismo que en el caso de *A. marginale*, donde los animales que no se desparasitaban no presentaron amplificación de ADN de *B. bigemina*. En este caso, vuelven a ser las mismas granjas, la granja nº 8 de Guadarrama y la nº 18 de Rivas-Vaciamadrid, cuyos animales pertenecen a las razas lidia y frisona, respectivamente, en las que no se ha detectado *B. bigemina* en este estudio. Ambas granjas, tal y como se mencionó previamente, no comparten pastos con otras ganaderías, y esta variable ha resultado ser también un factor de riesgo estadísticamente para este agente, al igual que para *A. marginale*. Se encontró una mayor detección de *B. bigemina* si se desparasitaba dos o más veces al año que si se realizaba este manejo en una única ocasión y la combinación de fármacos empleada que mostró las mayores tasas de prevalencia fue la de lactonas macrocíclicas y piretroides, lo que parece sugerir la necesidad de evaluación de los protocolos antiparasitarios empleados. Sin embargo, Almería y colaboradores (2009) no encontraron diferencias significativas entre la frecuencia o el producto utilizado para desparasitar y la prevalencia de *B. bigemina* (6%) en Menorca, donde se desparasitaba

con piretroides que se aplicaban cada mes y medio a dos meses cuando se observaban garrapatas, mientras que, en algunas granjas, se usaban organofosforados entre los tratamientos con piretroides (Almería y col., 2009). Del mismo modo que se discutió para *A. marginale*, estos resultados pueden mostrar una asociación con una mayor percepción de riesgo de parasitación por garrapatas por parte de ganaderos y veterinarios al cargo de los animales, que promovería una mayor presión para la desparasitación del ganado. Además, hay que tener en cuenta que se han descrito resistencias de *R. bursa* frente a piretroides y organofosforados (Enayati y col., 2009, Ziapour y col., 2016), así como otras poblaciones de garrapatas del género *Rhipicephalus* frente a lactonas macrocíclicas (Rodríguez-Vivas y col., 2018). Por otra parte, aunque con una menor importancia epidemiológica que para *A. marginale*, no debemos olvidar la posible transmisión mecánica iatrogénica de *B. bigemina* mediante la inoculación subcutánea del agente, lo que podría favorecerse si se emplea la misma aguja en la desparasitación de los bovinos.

Zanet y colaboradores publicaron en 2014 el primer artículo en el que se describe que *B. bigemina* infecta a ungulados salvajes (corzo, ciervo y jabalí) en Europa, sugiriendo la existencia de un ciclo epidemiológico común entre la vida silvestre y el ganado con el que comparte pastos, ya que el ganado es el reservorio reconocido de este parásito (Zanet y col., 2014). Previamente, en América del Norte también se detectó *B. bigemina* en ciervos de cola blanca, comentando que es necesario clarificar el posible papel del ciervo como reservorio en el mantenimiento de *B. bigemina*, siendo fundamental para comprender si los ciervos contribuyen o no a la epidemiología de la babesiosis bovina (Holman y col., 2011). En un estudio realizado en dos zonas del norte de España, País Vasco y Cataluña, no se detectó ADN de *B. bigemina* en los rumiantes silvestres muestreados (García-Sanmartín y col., 2007) y, sin embargo, los resultados de nuestro trabajo muestran que los rumiantes silvestres (principalmente en zonas con cabras montesas y corzos) son un factor de riesgo para la infección de los bovinos por *B. bigemina*. Por el contrario, la presencia de aves rapaces y carnívoros silvestres (zorro, tejón y lobo), depredadores naturales de la fauna, así como la existencia de otros animales domésticos en contacto con el ganado, actuaron en este trabajo como un factor de protección frente a la infección por *B. bigemina*, mientras que la presencia de jabalíes y de lepóridos no actuó sobre la prevalencia de este agente. Tal y como han señalado otros autores en la bibliografía, es necesario realizar nuevos estudios encaminados a aclarar el papel de la fauna silvestre en la epidemiología de estos agentes (Gortázar y col., 2007). No obstante, también debe ser tenido en cuenta que las diferentes características de manejo de las explotaciones ganaderas han podido influir en estos resultados.

A pesar de que la principal alteración que se produce en la analítica sanguínea en los bovinos con infección por *B. bigemina* es un descenso de los recuentos de hematíes, hematocrito y concentración de hemoglobina por la hemólisis característica (De Vos y col., 2004), en nuestro estudio los animales en cuyas muestras se detectó ADN de este agente no mostraron anemia, sino que, por el contrario, el valor medio de recuento eritrocitario se encontró ligeramente por encima en los animales positivos en comparación con los negativos a este agente. En un único animal se observó una ligera disminución del hematocrito (21,7%). Los niveles de VCM y HCM fueron significativamente más bajos en los animales positivos que en los negativos, aunque debe destacarse que se encontraron dentro del rango de referencia para la especie. Estudios previos han mostrado igualmente valores inferiores de VCM en los bovinos con infección por *B. bigemina*, no acompañados de la disminución del número de eritrocitos, hemoglobina y hematocrito (Aulakh y col., 2005, Sharma y col., 2016). Estos autores sugieren que los índices eritrocitarios VCM y HCM pueden mostrar una ligera disminución 7-15 días después del tratamiento, debido a la respuesta ósea para iniciar el proceso de eritropoyesis (Aulakh y col., 2005), lo que podría suceder también en los animales que se recuperan de una reinfección.

Tras la crisis hemolítica causada por *B. bigemina* en el hospedador bovino, se describe en la bibliografía una breve linfocitosis que causa leucocitosis (Camacho, 2002, Zintl y col., 2003). En este trabajo de tesis doctoral se ha observado un incremento estadísticamente significativo de los recuentos medios de leucocitos totales y de linfocitos y basófilos en los animales positivos a esta babesia en comparación con los negativos. Concretamente, 23 de los 75 animales positivos de los que se pudo realizar analítica sanguínea presentaban leucocitosis por linfocitosis. En el caso del valor de los basófilos, si bien el recuento medio es ligeramente superior en los bovinos a partir de cuyas muestras se amplificó ADN de *B. bigemina* en este estudio ( $0,09 \pm 0,05 \times 10^3/\mu\text{l}$  en comparación con  $0,06 \pm 0,05 \times 10^3/\mu\text{l}$  en los negativos) en todos los animales estos recuentos se encontraron dentro del rango de referencia para la especie y el bajo número de estas células en sangre periférica hace que pequeñas variaciones como las descritas se interpreten con cautela, especialmente teniendo en cuenta la ausencia de descripciones en la bibliografía de una afectación de este tipo leucocitario en el curso de las babesiosis bovinas.

En el árbol de decisiones mostrado al final del apartado de resultados de *B. bigemina* de esta memoria podemos observar que existe un mayor riesgo de infección por este agente en función de la raza de los animales, cuyas granjas se encuentran en las zonas M y F, y se comparta pastos con otras ganaderías.



Como conclusión, *B. bigemina* se encuentra infectando a los bovinos de la Comunidad de Madrid, especialmente a aquellos que se localizan en las zonas M y F, zonas de preferencia por sus características climáticas para su vector más probable en la península ibérica, *R. bursa*. La alta prevalencia detectada hace recomendable considerar este agente ante la presencia de signos clínicos compatibles con el desarrollo de una anemia hemolítica y evitar el traslado de animales desde zonas no endémicas a las zonas de clima de montaña y de clima mediterráneo continentalizado con veranos frescos, especialmente durante los períodos de máxima actividad de los vectores.

## 6.6. *Babesia divergens*

*B. divergens* es una especie que se encuentra principalmente en el bovino del norte y centro de Europa (Andersson y col., 2017), si bien puede extenderse hasta el norte de África (Zintl y col., 2014). García-Sanmartín y colaboradores describieron en la primera identificación molecular de este agente en la España peninsular que *B. divergens* presenta una prevalencia molecular del 1,1% (3/263 de tres granjas del norte y el sur) (García-Sanmartín y col., 2006), mientras que la prevalencia de este agente en una granja en Menorca con historial clínico previo de piroplasmosis cuyos animales de leche se encontraban en régimen de semiextensivo fue del 6% (2/33) (Ros-García, García-Pérez y col., 2012). *B. divergens* no había sido detectado previamente en Menorca en otros estudios también realizados mediante RLB, donde se incluyeron 119 animales de 12 granjas y 133 procedentes de tres granjas de producción de leche en semiextensivo (Almería y col., 2002, Almería y col., 2009). Tampoco se amplificó ADN de *B. divergens* en Toledo, donde se analizaron 28 bovinos de raza charolés de un mes a siete años de edad, ni en Cádiz a partir de 17 hembras cruzadas de charolés y retinta con edades comprendidas entre los seis meses y los tres años (Gubbels y col., 1999). En Galicia se obtuvo una seroprevalencia del 37,7% tras analizar 166 vacas mediante IFI en una tesis doctoral (Pallas, 1999). Mientras, en Portugal se han detectado prevalencias del 3,2% (35/1.104) en ganado vacuno de carne y leche expuesto a garrapatas de la zona centro y sur del país (Silva y col., 2010), siendo la especie de babesia más frecuentemente encontrada, y en otro estudio donde se incluyeron 1.407 animales de todo el país, se encontró un animal positivo de la zona de Alentejo, la principal área de producción ganadera en Portugal, que comprende el 47% del total de la población bovina (Gomes y col., 2013). Semejantes prevalencias moleculares se han encontrado en Italia, donde se encontró una prevalencia del 2,7% (5/187) en vacas de leche en Sicilia (Georges y col., 2001), mientras que en el centro y norte de la península itálica secuenciaron una muestra como *B. divergens* de 394

animales que pastaban al menos una vez al año (Cassini y col., 2012). En otro estudio donde se tomaron muestras en el sur, se amplificó ADN en dos vacas de carne de las 1.500 de leche y carne en extensivo o semiextensivo incluidos en el estudio (Ceci y col., 2014). Así, la prevalencia detectada en este trabajo de investigación, del 2,22% en ganado en extensivo de la Comunidad de Madrid (con 11 positivos de los 496 bovinos analizados), es similar a las previamente descritas en la literatura. En la zona centro de España no se han realizado estudios epidemiológicos, salvo la pequeña muestra que toma Gubbels y colaboradores (1999) para hacer una prueba de campo de la técnica RLB que habían desarrollado, así como tampoco en la Comunidad de Madrid.

Al analizar los datos de la reseña de los animales del estudio, no se encontraron asociaciones estadísticas entre la amplificación de ADN de *B. divergens* y la raza, el sexo y la edad. En la revisión de Zintl y colaboradores (2003), estos autores comentan que no se han publicado diferencias entre la susceptibilidad a *B. divergens* y la raza o el sexo de los animales (Zintl y col., 2003), pero no aclaran si se refieren a infección o a enfermedad clínica. En cuanto a la raza, en un estudio epidemiológico realizado en Francia, que incluyó 254 animales con razas frisona y montbéliarde principalmente, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas (Devos y Geysen, 2004). Tampoco se asoció el agente con la edad, ni analizando la variable de forma categórica (Silva y col., 2010, Ros-García, García-Pérez y col., 2012) ni de forma numérica (Devos y Geysen, 2004).

La positividad a la PCR empleada para detectar ADN de *B. divergens* se ha asociado tanto con la granja de procedencia de los animales como con el municipio y la zona en la que se encontrase. Concretamente la mayor prevalencia (y el mayor número de animales positivos) se detectó en la zona de clima de montaña (zona M, con 8,99% de prevalencia), con un 1,02% de prevalencia en la zona de clima mediterráneo continentalizado con veranos frescos (zona F) y sin detección del agente en la zona de clima con veranos cálidos (zona C). Las granjas donde se amplificó ADN de *B. divergens* que se encuentran en la zona de montaña, localizadas en Somosierra, Cercedilla y Prádena del Rincón, son municipios caracterizados por bosques caducifolios y helechos, hábitat donde predomina *I. ricinus* (Estrada-Peña y col., 2004), principal vector de este agente (Zintl y col., 2003), y se ha sugerido que estos microhábitats húmedos permiten el mantenimiento de esta especie de garrapata fuera de su rango habitual (Ruiz-Fons y col., 2006). En este sentido, nuestro estudio muestra igualmente la existencia de una mayor humedad relativa en el momento de la toma de las muestras que resultaron posteriormente positivas a la PCR del agente de interés. La distribución de *Ixodes ricinus* se extiende desde áreas del norte al sur de España (Ruiz-Fons y col., 2006), con mayor prevalencia en regiones del norte de nuestro país, donde *I. ricinus*



representó el 67% del total de las garrapatas adultas identificadas en un estudio de 2011, mientras que en la zona centro esta especie solo representó el 0,3% (Barandika y col., 2011) y en otro estudio realizado en Madrid la prevalencia de esta especie de garrapata fue del 0,5% (Toledo y col., 2009). Típicamente *I. ricinus* se encuentra en ambientes húmedos y fríos de Europa, pero también se ha evidenciado que el aumento de la temperatura media anual amplía la ventana de actividad de las garrapatas, al tener influencia positiva en la abundancia de ninfas de *I. ricinus* (Lindgren y col., 2000, Estrada-Peña y col., 2004, Ruiz-Fons y col., 2012, Zintl y col., 2014). El ciclo de vida de *I. ricinus* generalmente tarda tres años en completarse. Los adultos presentan actividad en el otoño, iniciándose en el mes de octubre, momento en que encontramos mayor número de animales positivos a la PCR de *B. divergens* en nuestro estudio (ocho de los 11 positivos), hasta mediados de marzo, mientras que las larvas y las ninfas están activas en primavera-verano (Estrada-Peña y col., 2004, Barandika y col., 2011, Colmenero, 2015). Tal y como se ha comentado previamente, no ha sido posible identificar las garrapatas presentes en el ganado o en las granjas de este estudio, pero se ha observado que existe un mayor riesgo estadístico de detección de ADN de *B. divergens* en los bovinos cuando se confirmó la presencia de garrapatas en el ganado en el momento de la toma de muestras en la granja. Sin embargo, el hecho de que los animales fuesen o no sometidos a desparasitaciones y el fármaco empleado en ellas no afectaron a la detección de *B. divergens* en los bovinos de esta tesis doctoral.

Muchos de los animales positivos a esta PCR, además de compartir pastos con otros rebaños, también lo hacían con rumiantes silvestres, carnívoros silvestres y aves rapaces, suponiendo todos estos factores un riesgo para presentar infección por *B. divergens*. No se asoció la detección de *B. divergens* en las muestras sanguíneas de los bovinos con la presencia en la zona de otros animales domésticos, jabalíes y lepóridos. Las larvas y ninfas de *I. ricinus* se alimentan principalmente de pequeños y medianos mamíferos, aves y reptiles, mientras que las garrapatas adultas se alimentan principalmente de ungulados (Ruiz-Fons y col., 2006, Skotarczak y col., 2008, Ruiz-Fons y col., 2012), lo que podría justificar una mayor abundancia del vector en presencia de posibles hospedadores para sus fases de desarrollo. Varios estudios han identificado *B. divergens* en diferentes especies de rumiantes silvestres, en renos, corzos y rebecos. Posteriormente se ha dudado en algunos casos, concretamente en los corzos y rebecos, de que se tratase de *B. divergens* o de otra especie relacionada, siendo necesario realizar estudios adicionales (Langton y col., 2003, García-Sanmartín y col., 2007, Hoby y col., 2007, Schmid y col., 2008). Además, se ha observado en un estudio realizado en Asturias una relación estadísticamente significativa entre larvas de *I. ricinus* y la presencia de caballos, siendo las larvas más abundantes en aquellos sitios

con mayor presencia de caballos (Ruíz-Fons y col., 2012), y curiosamente en nuestro estudio, en tres de las cinco granjas donde se amplificó *B. divergens*, los animales tenían contacto con caballos. No obstante, las diferentes zonas del estudio tienen una fauna distinta, no solo debido a las características climáticas, sino también por el uso del terreno por parte del hombre.

No se encontró asociación estadística entre la detección de ADN de *B. divergens* y la descripción por parte de ganaderos o veterinarios de casos clínicos compatibles con enfermedades de transmisión vectorial del bovino, si bien cabe destacar que en aquellas granjas en las que sí se habían observado signos tales como fiebre, anorexia o palidez de mucosas en el pasado no se detectó la presencia de *B. divergens*. En el momento de la toma de muestras, ninguno de los bovinos del estudio mostraba signos clínicos y, sin embargo, tres de ocho positivos a la PCR de *B. divergens* de los cuales fue posible disponer de analítica sanguínea presentaban leucocitosis por linfocitosis, indicando la posible existencia de una respuesta inflamatoria. En este sentido, se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el recuento medio de leucocitos totales y de linfocitos entre los animales positivos y los negativos a la PCR específica de este agente, siendo mayores estos valores en los animales con infección por *B. divergens*, aunque estos valores medios se mantuvieron dentro del rango de referencia para la especie en ambos casos. En la bibliografía se ha descrito que durante esta babesiosis puede desarrollarse una leucocitosis por linfocitosis, acompañada frecuentemente por neutropenia y monocitosis, que aparece tras la crisis hemolítica y suele ser breve (Camacho, 2002, Zintl y col., 2003). No obstante, en nuestro caso no se detectó que ninguno de los bovinos presentase anemia en el momento de la toma de muestras, lo que indica que posiblemente estos bovinos hayan superado previamente una fase aguda leve de esta babesiosis, con signos clínicos leves que, incluso, pasaron desapercibidos para los encargados de su cuidado, permaneciendo en la actualidad en una fase asintomática.

La epidemiología de *B. divergens* parece estar muy ligada a su vector, la garrapata *I. ricinus*, que no es muy frecuente en la zona centro, lo que concuerda con la baja prevalencia molecular hallada en este estudio en comparación con la de otros agentes de transmisión vectorial evaluados en los mismos animales. No obstante, parece que su larga persistencia en las garrapatas y la presencia de hospedadores bovinos susceptibles permiten su aparición en la Comunidad de Madrid, concretamente en aquellas zonas que se caracterizan por disponer de características climáticas y de flora adecuadas para el desarrollo de esta especie de garrapata.

## 6.7. *Theileria annulata*

La PCR empleada en este estudio para la detección de *Theileria annulata* mostró amplificación de este agente en 111 de los 496 animales muestreados, lo que supone una prevalencia en la Comunidad de Madrid del 22,38%. Estos animales pertenecían a 18 granjas (el 52,94% de las granjas muestreadas). Estos resultados se han incluido en el manuscrito titulado “*Molecular, epidemiological, haematological and biochemical evaluation in asymptomatic Theileria annulata infected cattle from an endemic region in Spain*” publicado recientemente en la revista *Ticks and Tick-borne Diseases*.

Los resultados de prevalencia obtenidos en este trabajo en el ganado vacuno de la Comunidad de Madrid son similares a los obtenidos por Gomes y colaboradores en 2013 en Portugal (21,3%, 300/1.407), encontrando diferencias entre las cinco regiones muestreadas y presentando la zona de Alentejo, que se localiza en la misma latitud que la Comunidad de Madrid y se caracteriza por un manejo extensivo de los animales destinados a producción de carne, una prevalencia molecular del 29,2% (175/599). Nuestros resultados son algo inferiores a los detectados por Martín-Sánchez y colaboradores en 1999 en Granada, donde determinan una prevalencia del 31,8% mediante PCR anidada a partir de 44 animales muestreados. Asimismo, se alejan de los obtenidos en un estudio preliminar a esta tesis con un pequeño muestreo de 80 animales pertenecientes a tres granjas en Madrid, de los municipios de Moralarzal (29,2%, 7/24), Pedrezuela (100%, 6/6) y Prádena del Rincón (42%, 21/50), donde se determinó una prevalencia global del 42,5% mediante la misma PCR utilizada en esta tesis (Calleja-Bueno, 2013). Sin embargo, es importante destacar que, al igual que sucede en diferentes estudios llevados a cabo en Menorca, en los que la prevalencia variaba entre el 41,3% y el 64,7% (Almería y col., 2001, Almería y col., 2002, Almería y col., 2009, Ros-García, García-Pérez y col., 2012), el porcentaje de animales positivos a *T. annulata* en este trabajo de tesis doctoral sufrió importantes variaciones entre granjas, desde el 5% hasta el 100%. Concretamente entre estos estudios de Menorca, cabe destacar que en dos de ellos se realizaron dos técnicas de diagnóstico molecular, PCR convencional y RLB con las mismas muestras de animales de tres granjas de producción de leche con exposición a garrapatas, obteniendo una prevalencia del 41,3% (55/133) (Almería y col., 2001) y del 61,6% (82/133) (Almería y col., 2002), respectivamente, poniendo de manifiesto que diferentes técnicas analíticas pueden llevar a prevalencias distintas. En otro de los estudios realizados en Menorca, *T. annulata* se amplifica en las 12 granjas que analiza, con prevalencias que van del 20 al 100%, con una media de 53,3% (Almería y col., 2009). Otros estudios llevados a cabo en la península ibérica han mostrado prevalencias moleculares muy elevadas, del 75%

(68/91) mediante PCR convencional en Extremadura con animales de leche y carne expuestos a garrapatas (d'Oliveira y col., 1995, Habela y col., 1999), en 26 de los 28 (92,8%) machos y hembras de raza charolesa con edades comprendidas entre un mes y siete años muestreados en Toledo (Gubbels y col., 1999) y del 100% en dos estudios realizados en Cádiz con 17 hembras cruzadas de charolés con retinta de seis meses a tres años de edad mediante RLB y en 26 animales mediante PCR anidada (Gubbels y col., 1999, Martín-Sánchez y col., 1999). Estas diferencias en la prevalencia pueden estar relacionadas tanto con los métodos de diagnóstico empleados en cada caso como con las características climáticas y de los sistemas de gestión empleados en estas regiones, que influyen en la distribución y abundancia del vector.

La prevalencia de infección por *T. annulata* aumenta con la edad de los bovinos de este estudio. Es bien conocido que en muchas enfermedades infecciosas y parasitarias los animales más jóvenes tienen una menor exposición que naturalmente aumentará con la edad. En relación al desarrollo de enfermedad clínica, Bouattour describió en 1987 que solo el 10% de los casos de theileriosis tropical se observaba en animales menores de un año. Los terneros incluidos en nuestro estudio comenzaron a pastar al aire libre desde el nacimiento. Según lo descrito por Ros-García y colaboradores (2012), estos terneros pueden tener protección debido al calostro y la exposición natural posterior los hace inmunes y menos susceptibles a la presencia de reacciones clínicas graves, por lo que se podría haber favorecido en las granjas de este estudio la estabilidad parásito-hospedador y la aparición de portadores asintomáticos.

Por otra parte, en el presente estudio, encontramos una mayor prevalencia de infección en bovinos cruzados y una menor prevalencia en las razas puras, principalmente en las razas frisona y avileña-negra ibérica, en comparación con el resto de las razas incluidas. Esta baja prevalencia en el ganado frisón podría ser sorprendente considerando estudios previos que han asociado una incidencia clínica relativamente alta de theileriosis con un aumento de la población de raza frisona que ha reemplazado progresivamente el fenotipo local (Preston y col., 2002, Glass y col., 2005). Además de considerar que los animales en nuestro estudio no mostraron signos clínicos en el momento de la toma de muestras, este hallazgo relacionado con las razas puede deberse a su distribución en las diferentes regiones evaluadas en la Comunidad con diferente clima, como ya se ha comentado previamente.

También hemos observado una prevalencia estadísticamente diferente de *T. annulata* entre las zonas y municipios donde se localizan las granjas del estudio, viéndose influenciada la prevalencia por la altitud y la temperatura en el momento del

muestreo, con una menor altitud media y una mayor temperatura media durante el muestreo en los animales positivos. Llama la atención en este estudio que, mientras en 16 de las 34 granjas muestreadas no se detectó ADN de *T. annulata* en las muestras sanguíneas de los bovinos, en cinco de las 18 en las que sí se detectó, el 100% de los animales mostraban infección por este agente de transmisión vectorial. Concretamente los municipios en los que se detectó la prevalencia del 100% fueron Fresnedillas de la Oliva, perteneciente a la zona de clima con veranos frescos (zona F) y Navalagamella y Getafe, de la zona C del estudio. Esta última zona se caracteriza por presentar un subtipo de clima mediterráneo continental, el cálido, con las características óptimas para *H. lusitanicum* (Estrada-Peña y col., 2004, Barandika y col., 2011). Gomes y colaboradores (2013) también encuentran diferencias entre las cinco regiones que estudian, con una mayor prevalencia en las regiones del sur, entre las que incluyen Alentejo, Lisboa y el Valle del Tajo, debido a una mayor carga de *H. lusitanicum* y *H. marginatum* en la mitad sur de Portugal.

Además, los animales de nuestro estudio pastorean en extensivo en zonas naturales que favorecen el mantenimiento de las poblaciones de garrapatas. *Hyalomma marginatum* y *Hyalomma lusitanicum* son los principales vectores de *T. annulata* en España y está bien documentado que *H. lusitanicum* es la especie de garrapata que predomina en la zona centro, tanto en la vegetación como en jabalíes y ganado (Estrada-Peña y Santos-Silva, 2005, Ruíz-Fons y col., 2006, Toledo y col., 2009, Colmenero, 2015). En la Comunidad de Madrid, *H. lusitanicum* fue la especie más abundante en diferentes estudios, representando el 54% (795/1.480) en un estudio de Toledo y colaboradores (2009), con 94 ejemplares recogidos de animales, concretamente de ganado vacuno (31), porcino (10) y ovino (30), mamíferos silvestres (22, en ciervo y jabalí) y una de aves, y 701 de la vegetación (Toledo, 2007, Toledo y col., 2009), mientras que Colmenero encontró una prevalencia del 44% de 1.035 garrapatas identificadas y recogidas durante todo el año principalmente de ciervos (245) y jabalíes (196) (Colmenero, 2015). Como se ha comentado anteriormente, en un estudio previo a esta tesis se identificaron algunos ejemplares como *H. marginatum* (Calleja-Bueno, 2013). Aunque no se pudo recoger garrapatas en todas las explotaciones en esta tesis doctoral, únicamente fue posible hacerlo en el caso de los animales de la granja de Prádena del Rincón, que fueron identificadas como *Hyalomma scupense*. Consideramos interesante indicar este hallazgo ya que se ha descrito esta especie como vector de *T. annulata* principalmente en el norte de África, pero tiene uno de los mayores rangos de distribución entre las especies del género *Hyalomma*, extendiéndose desde Europa occidental y el norte de África hasta el este de China (Apanaskevich y col., 2010), y se encuentran poblaciones permanentes en puntos de

Francia (Grech-Angelini y col., 2016), España (donde se identificó un ejemplar de 496 analizados en La Rioja recogido de una persona) (Oteo y col., 2006) e Italia (Tomassone y col., 2013), aunque se califica como no importante en la región mediterránea (Estrada-Peña y col., 2004, Estrada-Peña y col., 2013). Principalmente se alimenta de ganado vacuno y la infestación a menudo se asocia con establos de ganado, cobertizos y corrales donde se localizan en las grietas y hendiduras de las paredes (Estrada-Peña y col., 2004). En un estudio en Túnez, las garrapatas adultas estaban presentes desde mediados de junio hasta finales de noviembre, mientras que las ninfas se observaron desde principios de septiembre hasta finales de noviembre (Gharbi y col., 2013), aunque en otros estudios se han descrito periodos de actividad de las garrapatas adultas de enero a marzo en Córcega (Grech-Angelini y col., 2016) y de mayo a agosto en el norte de África (Gharbi y Darghouth, 2014).

No obstante, la positividad a *T. annulata* no se asoció estadísticamente con la presencia de garrapatas en las granjas en el momento del muestreo. *H. lusitanicum* presenta dos picos de actividad, uno en primavera y otro a principios del otoño (Habela y col., 2002), lo que coincide con los meses de mayor prevalencia de *T. annulata* del estudio, abril y septiembre. En la bibliografía se han descrito prevalencias más altas en los meses de marzo y junio (42,2% y 47,5%, respectivamente) con respecto a octubre (35,4%), aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (Almería y col., 2001). Mientras, los meses de septiembre y julio aparecen como los más prevalentes en una de las tres granjas que se monitorean cada dos meses durante un año en Menorca (Ros-García, García-Pérez y col., 2012).

Con respecto a las características de los sistemas productivos empleados en las granjas, se han encontrado algunos factores de riesgo asociados con la infección por *T. annulata*. La introducción de ganado foráneo y el pastoreo en pastos comunales con otros rebaños de ganado están relacionados con una mayor prevalencia de *T. annulata* en nuestro estudio y, del mismo modo, se han descrito en estudios previos como factores de riesgo que podrían aumentar la diseminación del parásito a otras áreas (Olmeda, Valcárcel y col., 2002).

El conocimiento de la epidemiología y la historia previa de casos clínicos de esta enfermedad en un área específica son importantes para el diseño y la implementación de estrategias de control. El método más ampliamente utilizado para el control de la theileriosis ha implicado el control de garrapatas con acaricidas (Dolan, 1989), habiéndose descrito que un control apropiado y estricto de garrapatas puede resultar en una reducción de la prevalencia de *T. annulata* (Almería y col., 2009). Cuanto más



frecuente es el tratamiento, mayor es la disminución de la frecuencia de la enfermedad, según Almería y colaboradores (2009). En este sentido, si bien en nuestro estudio se observó una menor prevalencia si los animales no eran desparasitados (lo que probablemente se asociaba con una menor carga de garrapatas en la región, que justificaría el que veterinarios y ganaderos optasen por no usar estos tratamientos, ante el bajo riesgo de parasitación de sus animales), sí se observó entre las granjas que desparasitaban una menor prevalencia en aquellas que lo hacían más a menudo. Así, las granjas de este estudio con un tratamiento ectoparasiticida más estricto tuvieron una menor prevalencia de infección, pasando de una prevalencia del 45,19% en las granjas donde se desparasitaba una vez al año al 16,03% y al 13,89% cuando se realizaba dos veces al año o más de dos veces al año, respectivamente. El uso de un solo ectoparasiticida, los piretroides o las lactonas macrocíclicas, podría no ser suficiente en áreas donde la prevalencia de *T. annulata* es alta, aunque el medicamento se usara dos veces al año, habiéndose detectado menores prevalencias en los casos de empleo de combinaciones de fármacos. Por tanto, el tratamiento antiparasitario con más de un producto utilizado con mayor frecuencia podría reducir la prevalencia del agente. Curiosamente, tal y como se ha indicado previamente, la prevalencia media de *T. annulata* fue menor, concretamente del 5% en comparación con el 24,94%, en rebaños que no recibieron ningún tratamiento ectoparasiticida en comparación con los que sí fueron desparasitados. Sin embargo, es interesante destacar que estos animales pertenecían a dos granjas, con prevalencias muy diferentes, del 30% en la granja nº 8 y del 0% en la granja nº 18. En la granja nº 18 el propietario no introduce nuevos animales, ya que realiza inseminación artificial y solo las novillas y las vacas secas pastan al aire libre, sin contacto con otros rebaños de ganado.

Aunque se necesita más información para determinar el papel de los animales silvestres en la dinámica de la población de garrapatas y en la epidemiología de este agente, se han detectado asociaciones estadísticamente significativas entre la presencia de jabalíes, conejos y liebres silvestres con *T. annulata*, pudiendo considerarse su presencia un factor de riesgo. Esto podría estar relacionado con el vector, *H. lusitanicum*, ya que sus adultos infestan a ungulados y las formas inmaduras se alimentan sobre pequeños animales, comúnmente liebres y conejos (Habela y col., 2002, Estrada-Peña y col., 2004). Por otro lado, se detectó una menor prevalencia de theileriosis ante la presencia de carnívoros y aves rapaces, posiblemente debido a su actividad de depredación en otros animales silvestres, lo que puede afectar a la población de garrapatas.

Todos los animales muestreados parecían estar sanos, pero el 22,38% de ellos ocultaban una infección asintomática por *T. annulata*. Este hallazgo puede ser epidemiológicamente significativo, ya que los portadores son importantes contribuyentes en la transmisión a animales susceptibles y a las garrapatas (d'Oliveira y col., 1995, Mans y col., 2015). La importancia de estos animales portadores también podría estar relacionada con las pérdidas económicas derivadas de una afectación de su productividad. En un estudio de campo en una región endémica en Túnez, una gran proporción de los costes estimados de la theileriosis tropical (50,8%) se contabilizaron como infecciones asintomáticas (Gharbi y col., 2006). La estabilidad endémica generalmente se produce en granjas con un manejo tradicional y se asocia principalmente con una baja incidencia de la enfermedad clínica, ya que el contacto constante con el agente confiere protección contra la reinfección (Preston y col., 1999). Nuestros resultados, con la presencia del agente en ganado asintomático, sugieren una situación endémica de theileriosis en los rebaños estudiados.

Se ha descrito que los bovinos con signos clínicos de theileriosis tienen valores significativamente menores de glóbulos rojos, hemoglobina y hematocrito que los animales sanos (Razavi y col., 2011, Abd, 2015) y la gravedad de la anemia aumenta a medida que progresa la parasitemia. Con un aumento en las tasas de parasitemia, los valores de VCM también aumentan (Nazifi y col., 2010). En nuestro estudio solo dos animales infectados por *T. annulata* presentaron valores ligeramente por debajo del límite inferior del rango de referencia para la especie para el recuento de eritrocitos (con 4,86 y 4,76 millones de glóbulos rojos por microlitro de sangre, rango de referencia:  $5-10 \times 10^3/\mu\text{l}$ ) y solo uno presentó un hematocrito del 21,7% (rango de referencia: 24-46%). De hecho, el estudio estadístico de los datos ha mostrado que el valor medio del hematocrito y de los índices eritrocitarios VCM y HCM eran superiores y el de CHCM era inferior en los bovinos en los que se ha detectado el agente en comparación con los negativos, si bien cabe destacar que las diferencias encontradas no eran muy grandes entre ambos valores y no tendrían una significación clínica. Concretamente, tal y como puede observarse en el apartado de resultados de esta tesis doctoral, los valores para los animales positivos a la PCR de *T. annulata* y para los negativos a este agente eran, respectivamente:  $32,47 \pm 3,32\%$  y  $31,52 \pm 4,72\%$  para el hematocrito;  $47,25 \pm 5,23$  fl y  $44,73 \pm 4,84$  fl para el VCM;  $18,26 \pm 2,07$  pg y  $17,46 \pm 1,95$  pg para la HCM; y  $38,65 \pm 1,08$  g/dl y  $39,01 \pm 0,98$  g/dl para la CHCM.

Con respecto a los parámetros hematológicos de la serie blanca, los valores medios se mantuvieron dentro del rango normal para la especie. Sin embargo, de acuerdo con un estudio previo (Ganguly y col., 2015), se encontró un recuento mayor



de eosinófilos en el ganado infectado con *T. annulata* en comparación con los animales no infectados. El número medio de plaquetas estaba dentro del rango normal en los animales en los que se detectó el agente, aunque significativamente por debajo del recuento medio obtenido en los animales que no presentaron amplificación de ADN de *T. annulata*. Se ha descrito que los bovinos con signos clínicos de theileriosis pueden presentar una trombocitopenia significativa (Abd, 2015), pero los animales de la muestra de este estudio no mostraron ningún signo clínico de la enfermedad. No obstante, en este sentido es interesante resaltar que 13 de los bovinos positivos a la PCR de este agente presentaban trombocitopenia, con valores que variaron entre 35.000 y 95.000 plaquetas por microlito. El recuento medio de basófilos también fue menor en los animales positivos, si bien este dato parece ser poco relevante en relación a la enfermedad y el bajo número de basófilos circulantes en el bovino hace que estas diferencias tengan escasa significación clínica.

En cuanto a la bioquímica, si bien 34 de los animales con infección por *T. annulata* presentaban hiperproteinemia, con valores que variaron entre 7,8 y 9 g/dl, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los positivos y los negativos a esta PCR. Se ha descrito un ligero incremento policlonal de la banda de las gammaglobulinas en los proteinogramas, sin embargo, en los casos graves se observa una disminución de las proteínas totales y de la albúmina como consecuencia de su pérdida a través de la orina y del daño renal (Camacho, 2002). Por el contrario, sí se observó que el valor de la ALT era estadísticamente menor en los animales positivos, manteniéndose, no obstante, dentro del rango de referencia para la especie, algo que también observaron Tuli y colaboradores (2015), aunque esas diferencias no fueron suficientes para ser significativas estadísticamente. Por otro lado, normalmente, los valores de las transaminasas hepáticas en theileriosis clínica se encuentran aumentadas como consecuencia del daño del tejido hepático (Sandhu y col., 1998).

En resumen, los datos recopilados en este estudio muestran la presencia de una alta prevalencia de infección por *T. annulata* en bovinos asintomáticos en la Comunidad de Madrid que refleja una situación endémica muy ligada a la distribución y el ciclo del vector garrapata, destacando la existencia de mayores prevalencias de infección por este agente en zonas de clima mediterráneo continentalizado con veranos cálidos, con altitud inferior a 800 metros, durante los meses de septiembre y abril y en sistemas ganaderos en los que se comparten pastos y se introducen animales de otras ganaderías. La descripción de los factores de riesgo previamente discutidos puede ser clave para el manejo de la enfermedad clínica o para el mantenimiento del estatus sanitario de la granja.

---

## 6.8. COINFECCIONES

---

La distribución de los agentes causantes de enfermedades transmitidas por garrapatas se solapa en algunas regiones geográficas, encontrándose a menudo varios de estos agentes de forma conjunta en un mismo hospedador (Gubbels y col., 1999, Georges y col., 2001, Simuunza y col., 2011). En este sentido, se ha descrito en la bibliografía que las coinfecciones debilitan el sistema inmunitario del hospedador y, en concreto, se han relacionado con un desarrollo exacerbado de la anaplasmosis clínica (Hofmann-Lehmann y col., 2004), si bien este extremo no ha sido observado en nuestro estudio.

El 19,5% de los bovinos de la Comunidad de Madrid presentan coinfecciones con varios agentes transmitidos por garrapatas de los evaluados en este proyecto investigador, con animales en esta situación en el 52,9% de las granjas muestreadas. Es interesante considerar que el 34,7% de los bovinos de este estudio presentaron infecciones simples por alguno de estos agentes y el 45,8% fueron negativos a todos ellos.

Las infecciones mixtas por agentes de transmisión vectorial son frecuentes en estudios en ganado vacuno de África subsahariana, con igual o mayor frecuencia que las infecciones simples (Simuunza y col., 2011, Moumouni y col., 2018). Además, encontramos diferentes estudios realizados en países del mediterráneo con tasas de coinfecciones similares e, incluso, superiores, a las halladas en nuestro trabajo. Concretamente se han hallado prevalencias del 15,1% al 22% de animales coinfectados en Turquía (Bilgiç y col., 2013, Zhou y col., 2016) y en el sur de Italia del 48,4% de coinfecciones con especies del género *Anaplasma*, *Babesia* y *Theileria* (Ceci y col., 2014). Igualmente, en Portugal se han descrito prevalencias del 5,3% al 17,5% de coinfecciones con diferentes especies del género *Babesia* y *Theileria* (Silva y col., 2010, Gomes y col., 2013), y en España se han detectado infecciones mixtas en ganado vacuno causadas también por especies de dichos géneros, con prevalencias que van del 5,4% en animales de granjas del norte del país (García-Sanmartín y col., 2006) al 48,8% en Menorca (Ros-García, García-Pérez y col., 2012). En concreto, un estudio preliminar desarrollado por este mismo grupo investigador, previo al desarrollo de esta tesis, mostró que la prevalencia de animales coinfectados con *A. marginale* y *T. annulata* fue del 4,6% en la zona centro de España, incluyéndose granjas de Madrid y de Ávila (Calleja-Bueno, 2013).

Entre los casos de coinfecciones detectadas en este trabajo, las muestras

sanguíneas de 74 bovinos (el 14,9% del total) presentaron amplificación de ADN de dos agentes, siendo la combinación más frecuente la de *A. marginale* y *T. annulata*, siendo ésta también la coinfección más frecuente en dos estudios realizados en Turquía (Bilgiç y col., 2013, Zhou y col., 2016), seguida de la de *A. marginale* y *B. bigemina*. En estos resultados debe ser considerada la prevalencia descrita previamente para cada uno de estos agentes. Los tres agentes en los que mayores prevalencias se han detectado en el ganado vacuno en extensivo de la Comunidad de Madrid son, por este orden: *A. marginale*, con una prevalencia del 30,04%; *T. annulata*, con un 22,38%; y *B. bigemina*, con un 21,98%. Por tanto, el hallazgo de que las coinfecciones más frecuentes sean precisamente las causadas por combinaciones de estas tres especies no resulta sorprendente. No obstante, entre las causas de estas combinaciones en concreto sería importante considerar los vectores descritos para cada agente, así como algunas de las relaciones epidemiológicas discutidas previamente. *B. divergens* y *A. phagocytophilum* han sido detectadas en un número mucho menor de animales, con prevalencias del 2,22% y 1,81%, respectivamente, mientras que *A. centrale* no ha sido detectado en ninguno de los bovinos muestreados. Por su parte, en 23 de los 496 bovinos del estudio (el 4,6%) se detectaron coinfecciones por tres agentes, siendo la combinación más frecuente la de *A. marginale*, *B. bigemina* y *T. annulata*, en 13 bovinos, seguida de la de *A. marginale*, *B. bigemina* y *B. divergens*, detectada en ocho animales.

Factores como la raza y la existencia de coinfecciones con los agentes estudiados se encuentran asociados en nuestro estudio. Un dato reconocido en la bibliografía es que el ganado *Bos taurus* es generalmente más susceptible a la mayoría de las enfermedades transmitidas por garrapatas, pero cabe señalar que las mismas consideraciones se aplican a las razas que no son autóctonas de una zona en concreto, nunca expuestas a un patógeno en particular (Jongejan y Uilenberg, 2004). En este estudio, la raza de lidia no mostró coinfecciones, detectándose únicamente infecciones simples, si bien éstas solo fueron detectadas en cuatro de los 26 animales de esta raza muestreada. Curiosamente, la otra raza en la que no fueron detectadas coinfecciones fue la raza frisona si bien en la interpretación de este resultado es probable que influya el hecho de que las granjas donde se encontraba este tipo de raza se localizaban predominantemente en la zona de clima mediterráneo continentalizado con veranos cálidos (C), no compartían pastos y los animales se encontraban menos expuestos a las garrapatas. Por el contrario, la raza charolesa presentó una mayor prevalencia de coinfección por dos agentes, y el grupo conjunto mestizo (los animales cruzados) fue en el que se detectó el mayor número de animales con coinfección por dos agentes, así como el mayor número y la mayor prevalencia de coinfección por tres agentes. En este resultado debe tenerse en cuenta la distribución geográfica de esta raza

(predominantemente en la zona con veranos frescos) y el hecho de que parece haber estado más expuesta a la presencia de garrapatas y generalmente comparte pastos con otros rebaños de ganado vacuno y animales silvestres (Gomes y col., 2013). En esta misma línea otro estudio también apunta que los animales cruzados parecen tener más probabilidades de albergar coinfecciones múltiples, pero probablemente esto no se debía al tipo de raza de ganado, sino a la prevalencia de los agentes en las zonas climáticas (Kolte y col., 2017).

Por otra parte, las coinfecciones fueron más frecuentes en determinadas granjas y municipios. Concretamente es interesante destacar que en el municipio de Gascones se detectaron 12 animales de los 45 muestreados con coinfección por dos agentes, mientras que en Pedrezuela ocho de los 20 bovinos muestreados presentaban coinfección por tres agentes, siendo siete los que presentaban esta coinfección múltiple en Prádena del Rincón. Al fijarnos en la zona concreta de procedencia de los animales, la menor prevalencia de coinfección fue detectada en la zona de clima con veranos cálidos (C). Este resultado no es sorprendente, teniendo en cuenta que en cuatro de los cinco agentes detectados en este estudio en el ganado vacuno de la Comunidad de Madrid presentaban menores prevalencias precisamente en esta zona, encontrándose únicamente una mayor prevalencia de *T. annulata* en esta región. Sin duda, en este resultado influye la distribución de las garrapatas, vectores de estos agentes, que ya ha sido discutido al discutir los resultados de cada uno de los agentes concretos.

Como es lógico, los animales estarán más expuestos tanto a infecciones simples como a coinfecciones por estos agentes cuanto mayor sea la exposición a las garrapatas, como se ha descrito en otros estudios (Moumouni y col., 2018). En este sentido, debe tenerse en cuenta el importante impacto que supone la presencia de condiciones climáticas favorables para las garrapatas (Simuunza y col., 2011), lo que se refleja en las asociaciones que se dan en nuestros resultados en relación con el mes y estación en que se tomaron las muestras, con mayores prevalencias de coinfecciones por dos y tres agentes en el mes de octubre, seguidos por los meses de abril y mayo, y donde una mayor humedad relativa se asocia con las infecciones mixtas.

En relación con algunas prácticas de manejo de las explotaciones de origen de los animales, se observa en nuestro trabajo que el hecho de que los animales compartan pastos con otros bovinos o con rumiantes silvestres y jabalíes puede considerarse como un factor de riesgo para la presencia de coinfecciones tanto por dos como por tres agentes. Por el contrario, la presencia de depredadores naturales de la fauna silvestre de esta zona (mamíferos carnívoros como lobos, tejones o zorros y aves rapaces) reduce la probabilidad de encontrar coinfecciones en los bovinos de la

Comunidad de Madrid. En estos resultados parece influir tanto la zona donde se encuentran las granjas de los animales, por diferencias tanto climáticas como de uso del terreno por parte del hombre, que afectan a la fauna silvestre, como a las poblaciones de garrapatas vectores, que en muchos casos prefieren o precisan de la presencia de rumiantes silvestres o pequeños mamíferos para el desarrollo de sus diferentes fases de desarrollo (Pfäffle y col., 2013, Estrada-Peña y de la Fuente, 2014).

Por otra parte, un resultado interesante de este estudio es el que los animales que no eran desparasitados no presentaron coinfecciones. Por el contrario, a mayor número de desparasitaciones al año, mayor prevalencia de detección de ADN de dos agentes simultáneamente en las muestras sanguíneas de los animales, lo que se podría explicar, al menos parcialmente, por la presencia de *A. marginale* en tres de las cuatro combinaciones de agentes que se presentan en este estudio y su posible transmisión iatrogénica. En cuanto al tipo de tratamiento utilizado, las lactonas macrocíclicas solas o en combinación suponen la presencia de una mayor prevalencia de coinfecciones. En un estudio realizado en la India se observó que la prevalencia de parásitos *Apicomplexa* fue significativamente menor en el ganado de las granjas donde se utilizaron tratamientos antiparasitarios, aunque, sin embargo, pareció no afectar a la prevalencia de las especies del género *Anaplasma* (Kolte y col., 2017)

Como ya ha sido indicado y discutido previamente, los animales de este estudio eran asintomáticos en el momento de la toma de muestras, aunque se detectaron algunas alteraciones en la analítica sanguínea, como será discutido a continuación. No se encontró asociación estadística entre la detección de coinfecciones causadas por dos de los agentes estudiados y la existencia de historial de casos clínicos compatibles con enfermedades de transmisión vectorial en la granja. Sin embargo, aunque no sea estadísticamente significativo, la prevalencia de estas coinfecciones por dos agentes sí fue mayor en caso de que los ganaderos y veterinarios describiesen su existencia en la granja. Del mismo modo, la prevalencia de coinfecciones por tres agentes fue mayor en las granjas con historial de enfermedades de transmisión vectorial, esta vez de forma estadísticamente significativa para un nivel de confianza del 95%. A pesar de que se ha correlacionado la reducción en el hematocrito con un aumento en el número de agentes que se encuentran causando coinfecciones en bovinos aparentemente sanos (Simuunza y col., 2011), los valores medios de la hematología en cuanto a la serie eritroide se encontraron dentro del rango normal y no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los animales sin amplificación de ADN de los agentes estudiados y los animales con infecciones mixtas. Las infecciones mixtas se asociaron con un incremento significativo de los leucocitos, junto con un incremento de los linfocitos y de los eosinófilos. Este hallazgo conduce a plantear la realización de

más estudios para comprender mejor las relaciones que se desarrollan entre los agentes y entre los agentes y el sistema inmunitario del hospedador (Ceci y col., 2014).

Tal y como indicaron Zhou y colaboradores en 2016, la comprensión de la comorbilidad de las enfermedades transmitidas por garrapatas puede proporcionar una base para el establecimiento de estrategias integrales para su diagnóstico y control (Zhou y col., 2016). Sin embargo, se necesitan estudios adicionales para dilucidar los efectos de estos agentes en un mismo hospedador y sus posibles efectos subclínicos y productivos.



## 7. CONCLUSIONES





---

Tras el análisis y discusión de los resultados obtenidos en este trabajo de investigación, se han obtenido las siguientes conclusiones:

1. La población de ganado vacuno mantenida en pastoreo en la Comunidad de Madrid se encuentra expuesta a la infección por *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina*, *Babesia divergens* y *Theileria annulata*, no detectándose evidencias moleculares de infección por *Anaplasma centrale*.
2. Se estima una prevalencia de *Anaplasma phagocytophilum* en los bovinos en extensivo de la Comunidad de Madrid del  $1,81 \pm 1,18\%$ , si bien este agente solo se detecta en granjas situadas en la zona con clima de montaña, a mayor altitud y con mayor humedad relativa, y en las muestras sanguíneas tomadas en los meses de septiembre y octubre. Se consideran factores de riesgo para la infección por este agente tanto la presencia de garrapatas durante el muestreo como la presencia de caballos, carnívoros silvestres, rumiantes silvestres y buitres o el empleo de prácticas de manejo frecuentes en la zona, como la introducción de animales procedentes de otras ganaderías y el uso de pastos compartidos.
3. La prevalencia de *Anaplasma marginale* en los bovinos mantenidos en condiciones de pastoreo en esta región del centro de España es del  $30,04 \pm 4,12\%$ , con variaciones en las diferentes zonas climáticas de la Comunidad de Madrid, siendo menor en la zona de clima mediterráneo continentalizado con veranos cálidos. La detección de este agente es más habitual en las muestras recogidas en los meses de abril y octubre, aumenta con la edad de los animales y es más frecuente en bovinos de la raza rubia gallega. El empleo de pastos compartidos con otras ganaderías y la presencia en las inmediaciones de jabalíes y rumiantes silvestres aumentan el riesgo de infección por *Anaplasma marginale* en el bovino.
4. *Babesia bigemina* causa infección en el  $21,98 \pm 3,72\%$  de los bovinos en extensivo de la Comunidad de Madrid, siendo más habitual en las zonas de clima de montaña y de clima mediterráneo continentalizado con veranos frescos y en muestras tomadas en el mes de abril. La prevalencia es mayor en los machos y en la raza charolesa y disminuye con la edad de los animales. Compartir pastos con otros rumiantes domésticos o

silvestres y la presencia de garrapatas en el momento del muestreo aumenta la frecuencia de detección de este agente por métodos moleculares. La infección por esta babesia en el bovino se asocia con la existencia de leucocitosis por linfocitosis.

5. Se confirma la infección por *Babesia divergens* en bovinos de la Comunidad de Madrid, con una prevalencia media del  $2,22 \pm 1,37\%$ , si bien este agente no está presente en la zona de clima mediterráneo continentalizado con veranos cálidos y la mayor prevalencia se observa en la zona de clima de montaña, estando asociada su detección con la recogida de muestras durante el mes de octubre. La presencia de garrapatas en los bovinos durante el muestreo, compartir pastos con rumiantes domésticos o silvestres y la presencia de carnívoros y aves rapaces en la zona son factores de riesgo para la detección de la infección por este agente, que se asocia con un aumento del recuento leucocitario total y de linfocitos.
6. La prevalencia media de *Theileria annulata* en los bovinos mantenidos en sistemas de extensivo en la Comunidad de Madrid es del  $22,38 \pm 3,72\%$ , con el mayor valor detectado en la zona de clima mediterráneo continentalizado con veranos cálidos. La detección de este agente es más habitual en los bovinos de razas conjunto mestizo y limusín y en aquellos cuyas muestras fueron tomadas durante los meses de septiembre y abril. Se consideran factores de riesgo para la infección por *Theileria annulata* en los bovinos de esta región prácticas de manejo que incluyen la introducción de animales de otras ganaderías y el compartir pastos con otros bóvidos, así como la existencia en la granja de historial clínico previo de enfermedades vectoriales y la presencia en la zona de jabalíes y lepóridos.
7. Se confirma la existencia de una prevalencia elevada de coinfecciones por agentes de transmisión vectorial en el ganado vacuno en extensivo de la Comunidad de Madrid. Concretamente, el  $19,5 \pm 3,53\%$  de los bovinos se encuentran infectados por dos o tres agentes de forma simultánea, encontrándose asociaciones entre la positividad a *Anaplasma marginale* y *Babesia bigemina*, *Anaplasma marginale* y *Theileria annulata*, *Anaplasma marginale* y *Babesia divergens*, y *Babesia bigemina* y *Babesia divergens*. Las características epidemiológicas

definidas para cada uno de los agentes estudiados se reflejan en las coinfecciones detectadas.

8. La infección por *Anaplasma marginale*, *Babesia bigemina* y *Theileria annulata*, así como las coinfecciones por estos agentes de transmisión vectorial en los bovinos en extensivo de la Comunidad de Madrid, es más habitual en los animales que son sometidos a desparasitaciones en las granjas, lo que podría indicar la necesidad de revisión de los protocolos antiparasitarios que son utilizados en la actualidad.



## 8. RESUMEN



Las enfermedades de transmisión vectorial en el bovino tienen una gran repercusión económica y sobre la salud y bienestar de los animales y, sin embargo, muchas de las características de su epidemiología o, incluso, de su patogenia siguen sin esclarecerse. En este sentido, son escasos los estudios que han tratado de analizar la infección por estos agentes en el bovino del centro de España, por lo que en la presente tesis doctoral se ha tratado de evaluar la importancia epidemiológica de *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma marginale*, *Anaplasma centrale*, *Babesia bigemina*, *Babesia divergens* y *Theileria annulata* en el ganado vacuno mantenido en condiciones de pastoreo en las diferentes regiones climáticas de la Comunidad de Madrid.

Para ello, se ha incluido una muestra representativa del censo ganadero en extensivo de esta región del centro peninsular que, por las características propias de su sistema de manejo, podría encontrarse expuesto a la infección por diferentes agentes de transmisión vectorial. El número total de bovinos incluidos en este trabajo de investigación fue de 496, de los que se recogieron muestras sanguíneas que fueron analizadas empleando métodos moleculares (reacción en cadena de la polimerasa) para determinar la prevalencia de los agentes de interés. Asimismo, se realizaron hematología y bioquímica sanguínea básicas y se recogieron datos sobre la reseña de los animales, el entorno en el que se encontraban, el momento del muestreo y las características del sistema de manejo empleado.

Este estudio ha permitido comprobar que la población de ganado vacuno mantenida en pastoreo en la Comunidad de Madrid se encuentra expuesta a la infección por *A. phagocytophilum*, *A. marginale*, *B. bigemina*, *B. divergens* y *T. annulata*, no detectándose evidencias moleculares de infección por *A. centrale*. Los agentes para los que se detectó una mayor prevalencia molecular fueron *A. marginale*, con un  $30,04 \pm 4,12\%$ , seguido por *T. annulata*, con un  $22,38 \pm 3,72\%$ , y *B. bigemina*, con  $21,98 \pm 3,72\%$ . Las prevalencias de *B. divergens* y *A. phagocytophilum*, agentes no descritos previamente en bovinos del centro de España, fueron muy inferiores, de tan solo un  $2,22 \pm 1,37\%$  y un  $1,81 \pm 1,18\%$ , respectivamente. Además, el  $19,5 \pm 3,53\%$  de los animales estaban coinfectados con dos o tres agentes simultáneamente, encontrándose asociaciones entre la positividad a *A. marginale* y *B. bigemina*, *A. marginale* y *T. annulata*, *A. marginale* y *B. divergens*, y *B. bigemina* y *B. divergens*.

*A. marginale* y *B. bigemina* presentaron grandes similitudes en las relaciones epidemiológicas detectadas. Ambos agentes resultaron ser más prevalentes en animales que se encontraban en las zonas con clima de montaña y clima mediterráneo continentalizado con veranos frescos y en las muestras tomadas durante los meses de



abril y octubre, lo que podría deberse a la estrecha relación con los ciclos biológicos de sus vectores. Entre las razas en las que se detectaron mayores prevalencias de infección por estos agentes destacan la rubia gallega y la charolesa, mientras que en el ganado bravo no se detectó infección por ninguno de los dos patógenos y en un único animal de raza frisona se confirmó la infección por *A. marginale*, sin evidencia de infección por *B. bigemina*. Los bovinos que compartían pastos con otras ganaderías o con rumiantes silvestres presentaron mayores tasas de infección por estos dos agentes.

En la zona con menor altitud de la Comunidad de Madrid, donde habitualmente se registran temperaturas medias mayores, al tratarse del clima mediterráneo continentalizado con veranos cálidos, se detectó una prevalencia estadísticamente mayor de *T. annulata*. La detección de este agente fue más habitual en las muestras tomadas durante septiembre y abril y en los bovinos de raza conjunto mestizo y limusín, pudiendo considerarse asimismo como factores de riesgo el uso de pastos compartidos con otras ganaderías o la introducción de animales procedentes de otras granjas, el que en la zona se encuentren jabalíes y lepóridos y la descripción por parte de ganaderos y veterinarios de casos clínicos previos compatibles con enfermedades de transmisión vectorial.

El que los animales sean desparasitados resultó ser un factor de riesgo para la infección por los tres agentes más prevalentes en este estudio (*A. marginale*, *T. annulata* y *B. bigemina*), lo que sugiere la necesidad de replantear los protocolos antiparasitarios que son utilizados en la actualidad.

La detección por vez primera en la Comunidad de Madrid de la infección en el bovino por *A. phagocytophilum* y por *B. divergens* tiene especial interés, al ser ambos agentes potencialmente zoonóticos. Al igual que lo descrito para *A. marginale* y *B. bigemina*, *A. phagocytophilum* y *B. divergens* mostraron una estrecha relación en cuanto a las características epidemiológicas confirmadas por el análisis estadístico realizado. En ambos casos, la prevalencia en el bovino en extensivo fue baja, de en torno al 2%, y se pudo comprobar la tendencia a la localización de estos agentes en zonas de mayor altitud y humedad relativa y temperatura inferior. Concretamente la infección por *A. phagocytophilum* únicamente se detectó en bovinos de granjas localizadas en la zona de clima de montaña, siendo la prevalencia de *B. divergens* superior en esta misma zona en comparación con la observada en la zona de clima mediterráneo continentalizado con veranos frescos. Ninguno de estos dos agentes fue detectado en el bovino de la zona de clima mediterráneo continentalizado con veranos cálidos y se obtuvieron las mayores prevalencias en las muestras tomadas durante el mes de octubre. En el caso

de estos dos agentes, se confirmaron como factores de riesgo el que los animales compartiesen pastos con otros rumiantes domésticos o silvestres, la presencia en las inmediaciones de carnívoros silvestres y aves rapaces y la detección de garrapatas en la ganadería durante el muestreo.

Los resultados aportados por este trabajo de investigación pueden ser de utilidad en un intento de comprender la epidemiología de estos agentes en el ganado vacuno en extensivo de la Comunidad de Madrid. Asimismo, confirma la existencia en la región de un alto porcentaje de animales que pueden actuar como portadores de agentes infecciosos y parasitarios en una aparente estabilidad parásito-hospedador que, sin embargo, causa en algunos de los casos ligeras alteraciones de la analítica sanguínea.



## 9. SUMMARY



Bovine vector-borne diseases have a considerable economic impact worldwide and affect health and welfare of animals. However, different aspects of their epidemiology or even their pathogenesis remain unclear. In this sense, few studies have analyzed the infection by these agents in cattle of Central Spain, so the epidemiological importance of *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma marginale*, *Anaplasma centrale*, *Babesia bigemina*, *Babesia divergens* and *Theileria annulata* in cattle in grazing condition from different climate areas in the Community of Madrid has been evaluated in this thesis.

A representative sample of the cattle population in extensive management of this region has been included in this study, taking into account that the characteristics of the management system employed could favour their exposition to different vector borne agents. Finally, a total number of 496 cattle were included, from which blood samples were drawn and analyzed using molecular methods (polymerase chain reaction) to determine the prevalence of the agents of interest. In addition, hematological and biochemistry profiles were performed and data regarding the signalment of the animals, the environment, the moment of sampling and the characteristics of the management system used were collected.

This study has shown that the cattle kept on pasture in the Community of Madrid are exposed to infection by *A. phagocytophilum*, *A. marginale*, *B. bigemina*, *B. divergens* and *T. annulata*, with no molecular evidence of *A. centrale* infection in this bovine population. *A. marginale* showed the highest molecular prevalence ( $30.04 \pm 4.12\%$ ), followed by *T. annulata* ( $22.38 \pm 3.72\%$ ) and *B. bigemina* ( $21.98 \pm 3.72\%$ ). *B. divergens* and *A. phagocytophilum* have not been previously described in bovines in central Spain and their prevalences detected in this study were low ( $2.22 \pm 1.37\%$  and  $1.81 \pm 1.18\%$ , respectively). In addition,  $19.5 \pm 3.53\%$  of the animals were coinfecting with two or three agents, with statistical associations between positivity to *A. marginale* and *B. bigemina*, *A. marginale* and *T. annulata*, *A. marginale* and *B. divergens*, and *B. bigemina* and *B. divergens*.

The epidemiological characteristics of *A. marginale* and *B. bigemina* detected in this study showed great similarities. A higher prevalence of both agents was found in the mountain climate area and in warm-summer continental Mediterranean climate area and in samples collected during the months of April and October, probably related to the biological cycles of its vectors. The higher prevalences of these agents were detected in Rubia Gallega and Charolais breed, while no infection was detected in Lidia breed and a single Friesian animal was infected by *A. marginale* but not by *B. bigemina*.

Cattle grazing on pasture with other herds of cattle or with wild ruminants had higher rates of infection by these two agents.

The lowest altitude area in the Community of Madrid, where average temperatures are usually higher, with a hot-summer continental Mediterranean climate, showed the highest *T. annulata* prevalence. The detection of this agent was more common in the samples collected during September and April and in crossbreed and Limousin breed. The use of pastures shared with other herds, the introduction of foreign livestock, the contact with wild boar and leporidae and previous clinical cases of vector-borne diseases reported by farmers and veterinarian practitioners could be considered as risk factors for this infection.

The use of ectoparasiticide treatment was a risk factor for infection by the three most prevalent agents in this study (*A. marginale*, *T. annulata* and *B. bigemina*). This finding could lead to reconsider the ectoparasiticide protocols that are used nowadays in this area.

The first detection of *A. phagocytophilum* and *B. divergens* in cattle from the Community of Madrid is of special interest, as these agents are potentially zoonotic. As described for *A. marginale* and *B. bigemina*, *A. phagocytophilum* and *B. divergens* showed a close relationship in epidemiological characteristics confirmed by the statistical analysis. In both cases, the prevalence in cattle in extensive management was low, around 2%, and it was possible to confirm that these agents are found in areas of higher altitude and relative humidity and lower temperature. Specifically, *A. phagocytophilum* infection was only detected in cattle from farms located in the mountain climate area, being the prevalence of *B. divergens* higher in this same area compared to that observed in the area with warm-summer continental Mediterranean climate. Neither of these agents was detected in the bovines located in the hot-summer continental Mediterranean climate area and the highest prevalences were obtained in the samples drawn in October. Grazing on pastures with other domestic or wild ruminants, the presence of wild carnivores and raptors and the detection of ticks in livestock during the moment of blood samples were confirmed as risk factors for the detection of infection by these pathogens in the bovine population.

The results obtained in this study could be useful in an attempt to understand the epidemiology of these agents in cattle managed in extensive system in the Community of Madrid. In addition, it confirms the presence in the region of a high percentage of animals that can act as carriers of infectious and parasitic agents in an

apparent parasite-host stability that, however, causes in some cases slight alterations in blood analysis





## 10. BIBLIOGRAFÍA



- Abbott, J.R., Palmer, G.H., Kegerreis, K.A., Hetrick, P.F., Howard, C.J., Hope, J.C., Brown, W.C., 2005. Rapid and long-term disappearance of CD4 T lymphocyte responses specific for *Anaplasma marginale* major surface protein-2 (MSP2) in MSP2 vaccinates following challenge with live *A. marginale*. *The Journal of Immunology* 174, 6702-6715.
- Abd Ellah, M.R., 2015. Studying the correlations among hematological and serum biochemical constituents in cattle theileriosis. *J. Parasit. Dis.* 39, 134-139.
- Abutarbush, S.M., 2015. Hematological and serum biochemical findings in clinical cases of cattle naturally infected with lumpy skin disease. *The Journal of Infection in Developing Countries* 9, 283-288.
- Acero Adámed, P., 2009. Planificación y manejo de la explotación de Vacuno.
- Adjou Moumouni, P.F., Aplogan, G.L., Katahira, H., Gao, Y., Guo, H., Efstratiou, A., Jirapattharasate, C., Wang, G., Liu, M., Ringo, A.E., Umemiya-Shirafuji, R., Suzuki, H., Xuan, X., 2018. Prevalence, risk factors, and genetic diversity of veterinary important tick-borne pathogens in cattle from *Rhipicephalus microplus*-invaded and non-invaded areas of Benin. *Ticks Tick Borne Dis.* 9, 450-464.
- Adl, S.M., Simpson, A.G., Lane, C.E., Lukeš, J., Bass, D., Bowser, S.S., Brown, M.W., Burki, F., Dunthorn, M., Hampl, V., 2012. The revised classification of eukaryotes. *J. Eukaryot. Microbiol.* 59, 429-514.
- Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, 2003. Ficha técnica IMIZOL. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, 1-5.
- Aguirre, D.H., Gaido, A.B., Vinabal, A.E., De Echaide, S.T., Guglielmone, A.A., 1994. Transmission of *Anaplasma marginale* with adult *Boophilus microplus* ticks fed as nymphs on calves with different levels of rickettsaemia. *Parasite* 1, 405-407.
- Ahmed, J.S., Hartwig, H., Rothert, M., Steuber, S., Schein, E., 1989. Cytotoxicity and production of interleukin-2 and gamma-interferon by peripheral blood lymphocytes of *T. annulata*-infected cattle. *Immunobiology* 14, 175.
- Ahmed, J.S., Mehlhorn, H., 1999. The cellular basis of the immunity to and immunopathogenesis of tropical theileriosis. *Parasitol. Res.* 85, 539-549.
- Ahmed, J.S., Glass, E.J., Salih, D.A., Seitzer, U., 2008. Innate immunity to tropical theileriosis. *Innate Immunity* 14, 5-12.
- Ait Hamou, S., Rahali, T., Sahibi, H., Belghyti, D., Losson, B., Goff, W., Rhalem, A., 2012. Molecular and serological prevalence of *Anaplasma marginale* in cattle of North Central Morocco. *Res. Vet. Sci.* 93, 1318-1323.
- Akkoyunlu, M., Fikrig, E., 2000. Gamma interferon dominates the murine cytokine response to the agent of human granulocytic ehrlichiosis and helps to control the degree of early rickettsemia. *Infect. Immun.* 68, 1827-1833.
- Aktas, M., Ozubek, S., 2017. Outbreak of anaplasmosis associated with novel genetic variants of *Anaplasma marginale* in a dairy cattle. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 54, 20-26.
- Aktas, M., Altay, K., Dumanli, N., 2011. Molecular detection and identification of *Anaplasma* and *Ehrlichia* species in cattle from Turkey. *Ticks and Tick-borne Diseases* 2, 62-65.
- Alberdi, M.P., Walker, A.R., Urquhart, K.A., 2000. Field evidence that roe deer (*Capreolus capreolus*) are a natural host for *Ehrlichia phagocytophila*. *Epidemiology & Infection* 124, 315-323.
- Alderink, F.J., Dietrich, R.A., 1983. Economic and Epidemiological Implications of Anaplasmosis in Texas Beef Cattle Herds. *Bulletin/Texas Agricultural Experiment Station*; no.1426.
- Alleman, A.R., Barbet, A.F., Sorenson, H.L., Strik, N.I., Wamsley, H.L., Wong, S.J., Chandrashaker, R., Gaschen, F.P., Luckschander, N., Bjöersdorff, A., 2006. Cloning and expression of the gene encoding the major surface protein 5 (MSP5) of *Anaplasma phagocytophilum* and potential application for serodiagnosis. *Veterinary clinical pathology* 35, 418-425.
- Allen, P.C., Kuttler, K.L., Amerault, T.E., 1981a. Clinical chemistry of anaplasmosis: blood chemical changes in infected mature cows. *Am. J. Vet. Res.* 42, 322-325.
- Allen, P.C., Kuttler, K.L., Amerault, T.E., 1981b. Clinical chemistry of anaplasmosis: comparative serum protein changes elicited by attenuated and virulent *Anaplasma marginale* isolates. *Am. J. Vet. Res.* 42, 326-328.

- Allred, D.R., 2003. Babesiosis: persistence in the face of adversity. *Trends Parasitol.* 19, 51-55.
- Allred, D.R., Al-Khedery, B., 2006. Antigenic variation as an exploitable weakness of babesial parasites. *Vet. Parasitol.* 138, 50-60.
- Allred, D.R., McGuire, T.C., Palmer, G.H., Leib, S.R., Harkins, T.M., McElwain, T.F., Barbet, A.F., 1990. Molecular basis for surface antigen size polymorphisms and conservation of a neutralization-sensitive epitope in *Anaplasma marginale*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87, 3220-3224.
- Allsopp, B.A., Baylis, H.A., Allsopp, M.T., Cavalier-Smith, T., Bishop, R.P., Carrington, D.M., Sohanpal, B., Spooner, P., 1993. Discrimination between six species of *Theileria* using oligonucleotide probes which detect small subunit ribosomal RNA sequences. *Parasitology* 107 (Pt 2), 157-165.
- Allsopp, M.T., Cavalier-Smith, T., De Waal, D.T., Allsopp, B.A., 1994. Phylogeny and evolution of the piroplasms. *Parasitology* 108 (Pt 2), 147-152.
- Allsopp, M., Visser, E.S., du Plessis, J.L., Vogel, S.W., Allsopp, B.A., 1997. Different organisms associated with heartwater as shown by analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences. *Vet. Parasitol.* 71, 283-300.
- Almería, S., Castella, J., Ferrer, D., Gutierrez, J.F., Estrada-Pena, A., Sparagano, O., 2002. Reverse line blot hybridization used to identify hemoprotozoa in Minorcan cattle. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 969, 78-82.
- Almería, S., Castellà, J., Ferrer, D., Ortuño, A., Estrada-Peña, A., Gutiérrez, J.F., 2001. Bovine piroplasms in Minorca (Balearic Islands, Spain): a comparison of PCR-based and light microscopy detection. *Vet. Parasitol.* 99, 249-259.
- Almería, S., Delgado-Neira, Y., Adelantado, C., Huguet, M., Vinent, J., Nicolas, A., 2009. Mediterranean theileriosis and other tick transmitted piroplasmoses in cattle in Minorca (Balearic Islands, Spain): the effect of tick control on prevalence levels analyzed by reverse line blot (RLB) macroarrays. *J. Parasitol.* 95, 598-603.
- Amusatogui, I., Sainz, A., Tesouro, M.A., 2006. Serological Evaluation of *Anaplasma phagocytophilum* Infection in Livestock in Northwestern Spain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1078, 487-490.
- Anderson, B.E., Dawson, J.E., Jones, D.C., Wilson, K.H., 1991. *Ehrlichia chaffeensis*, a new species associated with human ehrlichiosis. *J. Clin. Microbiol.* 29, 2838-2842.
- Andersson, M.O., Vichova, B., Tolf, C., Krzyzanowska, S., Waldenstrom, J., Karlsson, M.E., 2017. Co-infection with *Babesia divergens* and *Anaplasma phagocytophilum* in cattle (*Bos taurus*), Sweden. *Ticks Tick Borne Dis.* 8, 933-935.
- Apanaskevich, D.A., Filippova, N.A., Horak, I.G., 2010. The genus *Hyalomma* Koch, 1844. X. Redescription of all parasitic stages of *H. (Euhyalomma) scupense* Schulze, 1919 (= *H. detritum* Schulze) (Acari: Ixodidae) and notes on its biology. *Folia Parasitol.* 57, 69.
- Aranda, C., Habela, M.A., Rol, J.A., 1993. Contribución al estudio de la theileriosis bovina en la provincia de Granada.
- Archibald, R.A., 1898. Texas fever – Its history, cause and treatment; *Butchers' and Stockgrowers' Journal*, San Francisco .
- Ashuma, Sharma, A., Singla, L.D., Kaur, P., Bal, M.S., Batth, B.K., Juyal, P.D., 2013. Prevalence and haemato-biochemical profile of *Anaplasma marginale* infection in dairy animals of Punjab (India). *Asian Pac. J. Trop. Med.* 6, 139-144.
- Atif, F.A., 2015. *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum*: Rickettsiales pathogens of veterinary and public health significance. *Parasitol. Res.* 114, 3941-3957.
- Atif, F.A., Khan, M.S., Muhammad, F., Ahmad, B., 2013. Sero-epidemiological study of *Anaplasma marginale* among cattle. *J Anim Plant Sci* 23, 740-744.
- Aubry, P., Geale, D.W., 2011. A Review of Bovine Anaplasmosis. *Transboundary and Emerging Diseases* 58, 1-30.
- Aulakh, G.S., Singla, L.D., Kaur, P., Alka, 2005. Bovine babesiosis due to *Babesia bigemina*: Haematobiochemical and therapeutic studies. *Indian Journal of Animal Sciences* 75 (6), 617-622.

- Awad, H., Antunes, S., Galindo, R.C., do Rosario, V.E., de la Fuente, J., Domingos, A., El Hussein, A.M., 2011. Prevalence and genetic diversity of *Babesia* and *Anaplasma* species in cattle in Sudan. *Vet. Parasitol.* 181, 146-152.
- Ayllón, T., Diniz, P.P.V., Breitschwerdt, E.B., Villaescusa, A., Rodríguez-Franco, F., Sainz, A., 2012. Vector-borne diseases in client-owned and stray cats from Madrid, Spain. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 12, 143-150.
- Babes, V., 1888. Sur l'hémoglobinurie bacterienne du bœuf. *CR Acad.Sci* 107, 692-694.
- Bakheit, M.A., Latif, A.A., 2002. The innate resistance of Kenana cattle to tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection) in the Sudan. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 969, 159-163.
- Bakken, J.S., Dumler, J.S., 2015. Human granulocytic anaplasmosis. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 29, 341-355.
- Bakken, J.S., Dumler, J.S., 2006. Clinical diagnosis and treatment of human granulocytotropic anaplasmosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1078, 236-247.
- Baldridge, G.D., Scoles, G.A., Burkhardt, N.Y., Schloeder, B., Kurtti, T.J., Munderloh, U.G., 2009. Transovarial transmission of Francisella-like endosymbionts and *Anaplasma phagocytophilum* variants in *Dermacentor albipictus* (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 46, 625-632.
- Barandika, J.F., Berriatua, E., Barral, M., Juste, R.A., Anda, P., García-Pérez, A.L., 2006. Risk factors associated with ixodid tick species distributions in the Basque region in Spain. *Med. Vet. Entomol.* 20, 177-188.
- Barandika, J.F., Hurtado, A., García-Esteban, C., Gil, H., Escudero, R., Barral, M., Jado, I., Juste, R.A., Anda, P., García-Pérez, A.L., 2007. Tick-borne zoonotic bacteria in wild and domestic small mammals in northern Spain. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 6166-6171.
- Barandika, J.F., Olmeda, S.A., Casado-Nistal, M.A., Hurtado, A., Juste, R.A., Valcarcel, F., Anda, P., García-Pérez, A.L., 2011. Differences in questing tick species distribution between Atlantic and continental climate regions in Spain. *J. Med. Entomol.* 48, 13-19.
- Barber, R.D., Harmer, D.W., Coleman, R.A., Clark, B.J., 2005. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. *Physiol. Genomics* 21, 389-395.
- Barbet, A.F., Meeus, P., Belanger, M., Bowie, M.V., Yi, J., Lundgren, A.M., Alleman, A.R., Wong, S.J., Chu, F.K., Munderloh, U.G., 2003. Expression of multiple outer membrane protein sequence variants from a single genomic locus of *Anaplasma phagocytophilum*. *Infect. Immun.* 71, 1706-1718.
- Barbet, A.F., Palmer, G.H., Myler, P.J., McGuire, T.C., 1987. Characterization of an immunoprotective protein complex of *Anaplasma marginale* by cloning and expression of the gene coding for polypeptide Am105L. *Infect. Immun.* 55, 2428-2435.
- Barbet, A.F., Al-Khedery, B., Stuen, S., Granquist, E.G., Felsheim, R.F., Munderloh, U.G., 2013. An emerging tick-borne disease of humans is caused by a subset of strains with conserved genome structure. *Pathogens* 2, 544-555.
- Battilani, M., De Arcangeli, S., Balboni, A., Dondi, F., 2017. Genetic diversity and molecular epidemiology of *Anaplasma*. *Infection, Genetics and Evolution* 49, 195-211.
- Belkahlia, H., Ben Said, M., Alberti, A., Abdi, K., Issaoui, Z., Hattab, D., Gharbi, M., Messadi, L., 2015. First molecular survey and novel genetic variants' identification of *Anaplasma marginale*, *A. centrale* and *A. bovis* in cattle from Tunisia. *Infect. Genet. Evol.* 34, 361-371.
- Bell-Sakyi, L., Palomar, A.M., Bradford, E.L., Shkap, V., 2015. Propagation of the Israeli vaccine strain of *Anaplasma centrale* in tick cell lines. *Vet. Microbiol.* 179, 270-276.
- Bilgiç, H.B., Karagenç, T., Simuunza, M., Shiels, B., Tait, A., Eren, H., Weir, W., 2013. Development of a multiplex PCR assay for simultaneous detection of *Theileria annulata*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* in cattle. *Exp. Parasitol.* 133, 222-229.
- Birkenheuer, A.J., Levy, M.G., Breitschwerdt, E.B., 2003. Development and Evaluation of a Seminested PCR for Detection and Differentiation of *Babesia gibsoni* (Asian Genotype) and *B. canis* DNA in Canine Blood Samples. *J. Clin. Microbiol.* 41, 4172-4177.
- Bishop, R., Musoke, A., Morzaria, S., Gardner, M., Nene, V., 2004. *Theileria*: intracellular protozoan parasites of wild and domestic ruminants transmitted by ixodid ticks. *Parasitology* 129, S283.

- Bjöersdorff, A., Bergström, S., Massung, R.F., Haemig, P.D., Olsen, B., 2001. Ehrlichia-infected ticks on migrating birds. *Emerging Infectious Diseases* 7, 877.
- Blanco, J.R., Oteo, J.A., 2002. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 8, 763-772.
- Bock, R.E., de Vos, A.J., 2001. Immunity following use of Australian tick fever vaccine: a review of the evidence. *Aust. Vet. J.* 79, 832-839.
- Bock, R.E., de Vos, A.J., Kingston, T.G., McLellan, D.J., 1997. Effect of breed of cattle on innate resistance to infection with *Babesia bovis*, *B. bigemina* and *Anaplasma marginale*. *Aust. Vet. J.* 75, 337-340.
- Bock, R.E., Kingston, T.G., Standfast, N.F., de Vos, A.J., 1999. Effect of cattle breed on innate resistance to inoculations of *Babesia bigemina*. *Aust. Vet. J.* 77, 465.
- Bock, R., Jackson, L., de Vos, A., Jorgensen, W., 2004. Babesiosis of cattle. *Parasitology* 129 Suppl, 247.
- Bonnet, S., Jouglin, M., Malandrin, L., Becker, C., Agoulon, A., L'hostis, M., Chauvin, A., 2007. Transstadial and transovarial persistence of *Babesia divergens* DNA in *Ixodes ricinus* ticks fed on infected blood in a new skin-feeding technique. *Parasitology* 134, 197-207.
- Böse, R., Jorgensen, W.K., Dalgliesh, R.J., Friedhoff, K.T., de Vos, A.J., 1995. Current state and future trends in the diagnosis of babesiosis. *Vet Parasitol.* 57, 61-74.
- Bouattour, A., 1987. Aspects épidémiologiques de la theilériose bovine en Tunisie, son evolution 1983-1986. Communication Vth Veterinary Maghrebin Congres, Casablanca.
- Bouattour, A., Darghouth, M.A., 1996. First report of *Babesia divergens* in Tunisia. *Vet. Parasitol.* 63, 161-165.
- Bouattour, A., Darghouth, M.A., Miled, L.B., 1996. Cattle infestation by *Hyalomma* ticks and prevalence of *Theileria* in *H. detritum* species in Tunisia. *Vet. Parasitol.* 65, 233-245.
- Boulter, N., Hall, R., 1999. Immunity and vaccine development in the bovine theilerioses. 44, 41-97.
- Bown, K.J., Begon, M., Bennett, M., Woldehiwet, Z., Ogden, N.H., 2003. Seasonal Dynamics of *Anaplasma phagocytophila* in a Rodent-Tick (*Ixodes trianguliceps*) System, United Kingdom. *Emerging Infectious Diseases* 9, 63-70.
- Bown, K.J., Lambin, X., Ogden, N.H., Begon, M., Telford, G., Woldehiwet, Z., Birtles, R.J., 2009. Delineating *Anaplasma phagocytophilum* ecotypes in coexisting, discrete enzootic cycles. *Emerging infectious diseases* 15, 1948.
- Bradway, D.S., Torioni de Echaide, S., Knowles, D.P., Hennager, S.G., McElwain, T.F., 2001. Sensitivity and specificity of the complement fixation test for detection of cattle persistently infected with *Anaplasma marginale*. *J. Vet. Diagn. Invest.* 13, 79-81.
- Branco, S., Orvalho, J., Leitão, A., Pereira, I., Malta, M., Mariano, I., Carvalho, T., Baptista, R., Shiels, B.R., Peleteiro, M.C., 2010. Fatal cases of *Theileria annulata* infection in calves in Portugal associated with neoplastic-like lymphoid cell proliferation. *J Vet Sci.* 11, 27-34.
- Brandau, C., Monge, A., Fermín, M.L., Jiménez-Mazzucchelli, F., Tesouro, M.A., 1989. Tratamiento de la theileriosis bovina con parvacuona y buparvacuona; control y seguimiento. *The veterinary record (Edición Española)*, 279-281.
- Brayton, K.A., Kappmeyer, L.S., Herndon, D.R., Dark, M.J., Tibbals, D.L., Palmer, G.H., McGuire, T.C., Knowles, D.P., Jr., 2005. Complete genome sequencing of *Anaplasma marginale* reveals that the surface is skewed to two superfamilies of outer membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 844-849.
- Brizuela, C.M., Ortellado, C.A., Sanabria, E., Torres, O., Ortigosa, D., 1998. The safety and efficacy of Australian tick-borne disease vaccine strains in cattle in Paraguay. *Vet. Parasitol.* 76, 27-41.
- Brodie, T.A., 1985. Some aspects of tick-borne fever in sheep. PhD thesis. University of Gasgow. United Kingdom.
- Brouqui, P.H., Dumler, J.S., Lienhard, R., Brossard, M., Raoult, D., 1995. Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *The Lancet* 346, 782-783.
- Brown, C.G., 1997. Dynamics and impact of tick-borne diseases of cattle. *Trop. Anim. Health Prod.* 29, 3S.

- Brown, C.G., 1990. Control of tropical theileriosis (*Theileria annulata* infection) of cattle. *Parassitologia* 32, 23-31.
- Brown, W.C., 2001. Molecular approaches to elucidating innate and acquired immune responses to *Babesia bovis*, a protozoan parasite that causes persistent infection. *Vet. Parasitol.* 101, 233-248.
- Brown, W.C., Barbet, A.F., 2016. Persistent infections and immunity in ruminants to arthropod-borne bacteria in the family Anaplasmataceae. *Annual review of animal biosciences* 4, 177-197.
- Brown, W.C., McElwain, T.F., Hötzel, I., Ruef, B.J., Rice-Ficht, A.C., Stich, R.W., Suarez, C.E., Estes, D.M., Palmer, G.H., 1998. Immunodominant T-cell antigens and epitopes of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 92, 473-482.
- Brown, W.C., McElwain, T.F., Palmer, G.H., Chantler, S.E., Estes, D.M., 1999. Bovine CD4 T-lymphocyte clones specific for rhoptry-associated protein 1 of *Babesia bigemina* stimulate enhanced immunoglobulin G1 (IgG1) and IgG2 synthesis. *Infect. Immun.* 67, 155-164.
- Brown, W.C., Palmer, G.H., 1999. Designing blood-stage vaccines against *Babesia bovis* and *B. bigemina*. *Parasitology Today* 15, 275-281.
- Brown, W.C., Ruef, B.J., Norimine, J., Kegerreis, K.A., Suarez, C.E., Conley, P.G., Stich, R.W., Carson, K.H., Rice-Ficht, A.C., 2001. A novel 20-kilodalton protein conserved in *Babesia bovis* and *B. bigemina* stimulates memory CD4 T lymphocyte responses in *B. bovis*-immune cattle. *Mol. Biochem. Parasitol.* 118, 97-109.
- Brown, W.C., Shkap, V., Zhu, D., McGuire, T.C., Tuo, W., McElwain, T.F., Palmer, G.H., 1998. CD4(+) T-Lymphocyte and Immunoglobulin G2 Responses in Calves Immunized with *Anaplasma marginale* Outer Membranes and Protected against Homologous Challenge. *Infect. Immun.* 66, 5406-5413.
- Burridge, M.J., Kimber, C.D., McHardy, N., 1973. Detection of antibodies to *Babesia bigemina* in dried blood samples using the indirect fluorescent antibody test. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* 67, 191-195.
- Byaruhanga, C., Collins, N.E., Knobel, D.L., Khumalo, Z.T.H., Chaisi, M.E., Oosthuizen, M.C., 2018. Molecular detection and phylogenetic analysis of *Anaplasma marginale* and *Anaplasma centrale* amongst transhumant cattle in north-eastern Uganda. *Ticks Tick Borne Dis.* 9, 580-588.
- Cabezas-Cruz, A., Passos, L.M., Lis, K., Kenneil, R., Valdés, J.J., Ferrolho, J., Tonk, M., Pohl, A.E., Grubhoffer, L., Zweggarth, E., 2013. Functional and immunological relevance of *Anaplasma marginale* major surface protein 1a sequence and structural analysis. *PLoS One* 8, e65243.
- Cacciò, S., Cammà, C., Onuma, M., Severini, C., 2000. The  $\beta$ -tubulin gene of *Babesia* and *Theileria* parasites is an informative marker for species discrimination. *Int. J. Parasitol.* 30, 1181-1185.
- Calleja-Bueno, L., 2013. Estudio de prevalencia de *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma marginale* y *Theileria annulata* en ganado bovino en extensivo en la zona centro de España. Trabajo de fin de Máster, Universidad Complutense de Madrid. Madrid. 1-54.
- Calleja-Bueno, L., Sainz, A., García-Sancho, M., Rodríguez-Franco, F., Gonzalez-Martín, J.V., Villaescusa, A., 2017. Molecular, epidemiological, haematological and biochemical evaluation in asymptomatic *Theileria annulata* infected cattle from an endemic region in Spain. *Ticks Tick Borne Dis.* 8, 936-941.
- Callow, L.L., 1967. Sterile immunity, coinfectious immunity and strain differences in *Babesia bigemina* infections. *Parasitology* 57, 455-465.
- Callow, L.L., Hoyte, H., 1961. Transmission experiments using *Babesia bigemina*, *Theileria mutans*, *Borrelia* sp. and the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Aust. Vet. J.* 37, 381-390.
- Camacho García, A.T., 2002. Diagnostico laboratorial de las piroplasmosis bovinas. *Bovis* 108, 53-56.
- Caminade, C., McIntyre, K.M., Jones, A.E., 2018. Impact of recent and future climate change on vector-borne diseases. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*
- Campbel, J.D.M., Spooner, R.L., 1999. Macrophages Behaving Badly: Infected Cells and Subversion of Immune Responses to *Theileria annulata*. *Parasitology Today* 15, 10-16.
- Canadian Food Inspection Agency, Government of Canada, 2014. Canadian Food Inspection Agency (CFIA).



- Carcy, B., Précigout, E., Schetters, T., Gorenflot, A., 2006. Genetic basis for GPI-anchor merozoite surface antigen polymorphism of *Babesia* and resulting antigenic diversity. *Vet. Parasitol.* 138, 33-49.
- Carelli, G., Decaro, N., Lorusso, A., Elia, G., Lorusso, E., Mari, V., Ceci, L., Buonavoglia, C., 2007. Detection and quantification of *Anaplasma marginale* DNA in blood samples of cattle by real-time PCR. *Vet. Microbiol.* 124, 107-114.
- Carelli, G., Decaro, N., Lorusso, E., Paradies, P., Elia, G., Martella, V., Buonavoglia, C., Ceci, L., 2008. First report of bovine anaplasmosis caused by *Anaplasma centrale* in Europe. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1149, 107-110.
- Carlyon, J.A., Fikrig, E., 2003. Invasion and survival strategies of *Anaplasma phagocytophilum*. *Cell. Microbiol.* 5, 743-754.
- Cassini, R., Marcer, F., di Regalbono, A.F., Cancrini, G., Gabrielli, S., Moretti, A., Galuppi, R., Tampieri, M.P., Pietrobelli, M., 2012. New insights into the epidemiology of bovine piroplasmoses in Italy. *Vet. Parasitol.* 184, 77-82.
- Castro, M.B., Nicholson, W.L., Kramer, V.L., Childs, J.E., 2001. Persistent infection in *Neotoma fuscipes* (Muridae: Sigmodontinae) with *Ehrlichia phagocytophila* sensu lato. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 65, 261-267.
- Ceci, L., Decaro, N., Lorusso, E., Paradies, P., Elia, G., Martella, V., Buonavoglia, C., Carelli, G., 2008. First report of bovine anaplasmosis by *Anaplasma centrale* in Europe, molecular identification and phylogenetic analysis. *Vet. Res. Commun.* 32, 263-266.
- Ceci, L., Iarussi, F., Greco, B., Lacinio, R., Fornelli, S., Carelli, G., 2014. Retrospective study of hemoparasites in cattle in southern Italy by reverse line blot hybridization. *J. Vet. Med. Sci.* 76, 869-875.
- Centers for Disease Control and Prevention, 2018. Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades. 2018.
- Chaisi, M.E., Baxter, J.R., Hove, P., Choopa, C.N., Oosthuizen, M.C., Brayton, K.A., Khumalo, Z.T., Mutshembe, A.M., Mtshali, M.S., Collins, N.E., 2017. Comparison of three nucleic acid-based tests for detecting *Anaplasma marginale* and *Anaplasma centrale* in cattle. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 84, 1-9.
- Chaisi, M.E., Sibeko, K.P., Collins, N.E., Potgieter, F.T., Oosthuizen, M.C., 2011. Identification of *Theileria parva* and *Theileria* sp.(buffalo) 18S rRNA gene sequence variants in the African Buffalo (*Syncerus caffer*) in southern Africa. *Vet. Parasitol.* 182, 150-162.
- Chastagner, A., Dugat, T., Vourc'h, G., Verheyden, H., Legrand, L., Bachy, V., Chabanne, L., Joncour, G., Maillard, R., Boulouis, H., 2014. Multilocus sequence analysis of *Anaplasma phagocytophilum* reveals three distinct lineages with different host ranges in clinically ill French cattle. *Vet. Res.* 45, 114.
- Chastagner, A., Pion, A., Verheyden, H., Lourtet, B., Cargnelutti, B., Picot, D., Poux, V., Bard, E., Plantard, O., McCoy, K.D., 2017. Host specificity, pathogen exposure, and superinfections impact the distribution of *Anaplasma phagocytophilum* genotypes in ticks, roe deer, and livestock in a fragmented agricultural landscape. *Infection, Genetics and Evolution* 55, 31-44.
- Chauvin, A., L'hostis, M., Valentin, A., Précigout, E., Cesbron-Zeggane, N., Gorenflot, A., 1995. *Babesia divergens*: an ELISA with soluble parasite antigen for monitoring the epidemiology of bovine babesiosis. *Parasite* 2, 257-262.
- Chauvin, A., Moreau, E., Bonnet, S., Plantard, O., Malandrin, L., 2009. *Babesia* and its hosts: adaptation to long-lasting interactions as a way to achieve efficient transmission. *Vet. Res.* 40, 37.
- Chauvin, A., Valentin, A., Malandrin, L., L'Hostis, M., 2002. Sheep as a new experimental host for *Babesia divergens*. *Vet. Res.* 33, 429-433.
- Chen, S.M., Dumler, J.S., Bakken, J.S., Walker, D.H., 1994. Identification of a granulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. *J. Clin. Microbiol.* 32, 589-595.
- Chomel, B.B., Carniciu, M.L., Kasten, R.W., Castelli, P.M., Work, T.M., Jessup, D.A., 1994. Antibody prevalence of eight ruminant infectious diseases in California mule and black-tailed deer (*Odocoileus hemionus*). *J. Wildl. Dis.* 30, 51-59.
- Christensson, D.A., 1989. Inverse age resistance to experimental *Babesia divergens* infection in cattle. *Acta Vet. Scand.* 30, 453-464.

- Christensson, D.A., Moren, T., 1987. Seroresponse (IgG) after vaccination and natural infection of cattle with *Babesia divergens*. *Acta Vet. Scand.* 28, 393.
- Coetzee, J.F., Apley, M.D., Kocan, K.M., Jones, D.E., 2006a. Flow cytometric evaluation of selected antimicrobial efficacy for clearance of *Anaplasma marginale* in short-term erythrocyte cultures. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 29, 173-183.
- Coetzee, J.F., Apley, M.D., Kocan, K.M., Rurangirwa, F.R., Van Donkersgoed, J., 2005. Comparison of three oxytetracycline regimes for the treatment of persistent *Anaplasma marginale* infections in beef cattle. *Vet. Parasitol.* 127, 61-73.
- Coetzee, J.F., Schmidt, P.L., O'Connor, A.M., Apley, M.D., 2010. Seroprevalence of *Anaplasma marginale* in 2 Iowa feedlots and its association with morbidity, mortality, production parameters, and carcass traits. *Can. Vet. J.* 51, 862-868.
- Coetzee, J.F., Apley, M.D., 2006. Efficacy of enrofloxacin against severe experimental *Anaplasma marginale* infections in splenectomized calves. *Veterinary therapeutics: research in applied veterinary medicine* 7, 319-328.
- Coetzee, J.F., Apley, M.D., Kocan, K.M., 2006b. Comparison of the efficacy of enrofloxacin, imidocarb, and oxytetracycline for clearance of persistent *Anaplasma marginale* infections in cattle. *Veterinary Therapeutics* 7, 347.
- Collins, R.A., Werling, D., Duggan, S.E., Bland, A.P., Parsons, K.R., Howard, C.J., 1998.  $\gamma\delta$  T cells present antigen to CD4  $\alpha\beta$  T cells. *J. Leukoc. Biol.* 63, 707-714.
- Colmenero, C., 2015. Identificación de garrapatas recogidas en hospedadores animales y medio ambiente de la Comunidad de Madrid y Cataluña y determinación de la prevalencia de *Rickettsia* spp. en las mismas. Universidad Complutense de Madrid, 1-99.
- Comunidad de Madrid, 2014. Mapa municipios de la Comunidad de Madrid. 2014.
- Consejería de Medio Ambiente, Administración Local y Ordenación del Territorio, 2007. Atlas. El medio ambiente en la Comunidad de Madrid. , 13-26.
- Consejería de Medio Ambiente y Ordenación del Territorio de la Comunidad de Madrid, 2007. Catálogo de Montes de utilidad pública de la Comunidad de Madrid.
- Contreras, M., Alberdi, P., Mateos-Hernández, L., Fernández de Mera, Isabel G, García-Pérez, A.L., Vancová, M., Villar, M., Ayllón, N., Cabezas-Cruz, A., Valdés, J.J., 2017. *Anaplasma phagocytophilum* MSP4 and HSP70 proteins are involved in interactions with host cells during pathogen infection. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 7, 307.
- Contreras, M., Moreno-Cid, J.A., Domingos, A., Canales, M., Díez-Delgado, I., Pérez de la Lastra, José M, Sánchez, E., Merino, O., Zavala, R.L., Ayllón, N., Boadella, M., Villar, M., Gortázar, C., de la Fuente, J., 2015. Bacterial membranes enhance the immunogenicity and protective capacity of the surface exposed tick Subolesin-*Anaplasma marginale* MSP1a chimeric antigen. *Ticks and Tick-borne Diseases* 6, 820-828.
- Corona, B., Rodríguez, M., Martínez, S., 2005. Anaplasmosis bovina. REDVET. Revista Electrónica de Veterinaria 6.
- Coskun, A., Ekici, O.D., Guzelbektes, H., Aydogdu, U., Sen, I., 2012. Acute phase proteins, clinical, hematological and biochemical parameters in dairy cows naturally infected with *Anaplasma marginale*. *Kafkas Univ Vet Fak Derg* 18, 497-502.
- Courtney, J.W., Dryden, R.L., Montgomery, J., Schneider, B.S., Smith, G., Massung, R.F., 2003. Molecular characterization of *Anaplasma phagocytophilum* and *Borrelia burgdorferi* in *Ixodes scapularis* ticks from Pennsylvania. *J. Clin. Microbiol.* 41, 1569-1573.
- Criado-Fornelio, A., Martínez-Marcos, A., Buling-Sarana, A., Barba-Carretero, J.C., 2003. Molecular studies on *Babesia*, *Theileria* and *Hepatozoon* in southern Europe. Part II. Phylogenetic analysis and evolutionary history. *Vet. Parasitol.* 114, 173-194.
- Cuesta, I., González, L.M., Estrada, K., Grande, R., Zaballo, Á, Lobo, C.A., Barrera, J., Sánchez-Flores, A., Montero, E., 2014. High-quality draft genome sequence of *Babesia divergens*, the etiological agent of cattle and human babesiosis. *Genome announcements* 2, 1194.
- Cursino-Santos, J.R., Alhassan, A., Singh, M., Lobo, C.A., 2014. *Babesia*: impact of cold storage on the survival and the viability of parasites in blood bags. *Transfusion* 54, 585-591.

- Dahlgren, F.S., Mandel, E.J., Krebs, J.W., Massung, R.F., McQuiston, J.H., 2011. Increasing Incidence of Ehrlichia chaffeensis and Anaplasma phagocytophilum in the United States, 2000–2007. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 85, 124-131.
- Dahmani, M., Davoust, B., Benterki, M.S., Fenollar, F., Raoult, D., Mediannikov, O., 2015. Development of a new PCR-based assay to detect Anaplasmataceae and the first report of Anaplasma phagocytophilum and Anaplasma platys in cattle from Algeria. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 39, 39-45.
- Dantas-Torres, F., Chomel, B.B., Otranto, D., 2012. Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. *Trends Parasitol.* 28, 437-446.
- Darghouth, M.A., Bouattour, A., Kilan, M., 1999. Tropical theileriosis in Tunisia: epidemiology and control. *Parassitologia* 41, 33-36.
- Darghouth, M.E.A., Bouattour, A., Ben Miled, L., Kilani, M., Brown, C.G.D., 1996. Epidemiology of tropical theileriosis (Theileria annulata infection of cattle) in an endemic region of Tunisia: characterisation of endemicity states. *Veterinary Parasitology* 65, 199-211.
- de Castro, J.J., 1997. Sustainable tick and tickborne disease control in livestock improvement in developing countries. *Vet. Parasitol.* 71, 77-97.
- de la Fuente, J., Atkinson, M.W., Naranjo, V., Fernández de Mera, Isabel G, Mangold, A.J., Keating, K.A., Kocan, K.M., 2007. Sequence analysis of the msp4 gene of Anaplasma ovis strains. *Vet. Microbiol.* 119, 375-381.
- de la Fuente, J., Ayoubi, P., Blouin, E.F., Almazán, C., Naranjo, V., Kocan, K.M., 2005. Gene expression profiling of human promyelocytic cells in response to infection with Anaplasma phagocytophilum. *Cell. Microbiol.* 7, 549-559.
- de la Fuente, J., Estrada-Pena, A., Cabezas-Cruz, A., Kocan, K.M., 2016. Anaplasma phagocytophilum Uses Common Strategies for Infection of Ticks and Vertebrate Hosts. *Trends Microbiol.* 24, 173-180.
- de la Fuente, J., García-García, J.C., Blouin, E.F., Kocan, K.M., 2003. Characterization of the functional domain of major surface protein 1a involved in adhesion of the rickettsia Anaplasma marginale to host cells. *Vet. Microbiol.* 91, 265-283.
- de la Fuente, J., García-García, J.C., Blouin, E.F., Kocan, K.M., 2001. Differential adhesion of major surface proteins 1a and 1b of the ehrlichial cattle pathogen Anaplasma marginale to bovine erythrocytes and tick cells. *Int. J. Parasitol.* 31, 145-153.
- de la Fuente, J., García-García, J.C., Blouin, E.F., McEwen, B.R., Clawson, D., Kocan, K.M., 2001. Major surface protein 1a effects tick infection and transmission of Anaplasma marginale. *Int. J. Parasitol.* 31, 1705-1714.
- de la Fuente, J., Kocan, K.M., 2006. Strategies for development of vaccines for control of ixodid tick species. *Parasite Immunol.* 28, 275-283.
- de la Fuente, J., Kocan, K.M., 2001. Expression of Anaplasma marginale major surface protein 2 variants in persistently infected ticks. *Infect. Immun.* 69, 5151-5156.
- de la Fuente, J., Kocan, K.M., Blouin, E.F., Zivkovic, Z., Naranjo, V., Almazán, C., Esteves, E., Jongejan, F., Daffre, S., Mangold, A.J., 2010a. Functional genomics and evolution of tick-Anaplasma interactions and vaccine development. *Vet. Parasitol.* 167, 175-186.
- de la Fuente, J., Kocan, K.M., García-García, J.C., Blouin, E.F., Claypool, P.L., Saliki, J.T., 2002. Vaccination of cattle with Anaplasma marginale derived from tick cell culture and bovine erythrocytes followed by challenge-exposure with infected ticks. *Vet. Microbiol.* 89, 239-251.
- de la Fuente, J., Kocan, K.M., Blouin, E.F., Zivkovic, Z., Naranjo, V., Almazán, C., Esteves, E., Jongejan, F., Daffre, S., Mangold, A.J., 2010b. Functional genomics and evolution of tick-Anaplasma interactions and vaccine development. *Vet. Parasitol.* 167, 175-186.
- de la Fuente, J., Kopacek, P., Lew-Tabor, A., Maritz-Olivier, C., 2016. Strategies for new and improved vaccines against ticks and tick-borne diseases. *Parasite Immunol.* 38, 754-769.
- de la Fuente, J., Lew, A., Lutz, H., Meli, M.L., Hofmann-Lehmann, R., Shkap, V., Molad, T., Mangold, A.J., Almazán, C., Naranjo, V., 2005. Genetic diversity of Anaplasma species major surface proteins and implications for anaplasmosis serodiagnosis and vaccine development. *Animal health research reviews* 6, 75-89.

de la Fuente, J., Massung, R.F., Wong, S.J., Chu, F.K., Lutz, H., Meli, M., von Loewenich, F.D., Grzeszczuk, A., Torina, A., Caracappa, S., Mangold, A.J., Naranjo, V., Stuenkel, S., Kocan, K.M., 2005. Sequence analysis of the msp4 gene of *Anaplasma phagocytophilum* strains. *J. Clin. Microbiol.* 43, 1309-1317.

de la Fuente, J., Naranjo, V., Ruiz-Fons, F., Hofle, U., Fernandez De Mera, I G, Villanua, D., Almazan, C., Torina, A., Caracappa, S., Kocan, K.M., Gortazar, C., 2005. Potential vertebrate reservoir hosts and invertebrate vectors of *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum* in central Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 5, 390-401.

de la Fuente, J., Naranjo, V., Ruiz-Fons, F., Vicente, J., Estrada-Pena, A., Almazan, C., Kocan, K.M., Martín, M.P., Gortazar, C., 2004. Prevalence of tick-borne pathogens in ixodid ticks (Acari: Ixodidae) collected from European wild boar (*Sus scrofa*) and Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) in central Spain. *European Journal of Wildlife Research* 50, 187-196.

de la Fuente, J., Ruiz-Fons, F., Naranjo, V., Torina, A., Rodriguez, O., Gortazar, C., 2008. Evidence of *Anaplasma* infections in European roe deer (*Capreolus capreolus*) from southern Spain. *Res. Vet. Sci.* 84, 382-386.

de la Fuente, J., Thomas, E.J.G., Van Den Bussche, Ronald A, Hamilton, R.G., Tanaka, E.E., Druhan, S.E., Kocan, K.M., 2003. Characterization of *Anaplasma marginale* isolated from North American bison. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 5001-5005.

de la Fuente, J., Torina, A., Naranjo, V., Caracappa, S., Vicente, J., Mangold, A.J., Vicari, D., Alongi, A., Scimeca, S., Kocan, K.M., 2005. Genetic diversity of *Anaplasma marginale* strains from cattle farms in the province of Palermo, Sicily. *Journal of Veterinary Medicine, Series B* 52, 226-229.

de la Fuente, J., Van Den Bussche, Ronald A, Kocan, K.M., 2001. Molecular phylogeny and biogeography of North American isolates of *Anaplasma marginale* (Rickettsiaceae: Ehrlichieae). *Vet. Parasitol.* 97, 65-76.

de la Fuente, J., Vicente, J., Höfle, U., Ruiz-Fons, F., Fernández de Mera, I G, Van Den Bussche, R A, Kocan, K.M., Gortazar, C., 2004. *Anaplasma* infection in free-ranging Iberian red deer in the region of Castilla-La Mancha, Spain. *Vet. Microbiol.* 100, 163-173.

De Vos, A.J., 1991. Distribution, economic importance and control measures for *Babesia* and *Anaplasma*. Recent developments in the control of anaplasmosis, babesiosis and cowdriosis. *Proceedings of a workshop held at Ilirad Nairobi, Kenya*, 3-12.

De Vos, A.P., De Waal, D.T., Jackson, L.A., 2004. Bovine babesiosis. 1, 406-424.

DeNatale, C.E., Burkot, T.R., Schneider, B.S., Zeidner, N.S., 2002. Novel potential reservoirs for *Borrelia* sp. and the agent of human granulocytic ehrlichiosis in Colorado. *J. Wildl. Dis.* 38, 478-482.

Devos, J., Geysen, D., 2004. Epidemiological study of the prevalence of *Babesia divergens* in a veterinary practice in the mid-east of France. *Vet. Parasitol.* 125, 237-249.

Díaz-Regañón, D., Villaescusa, A., Ayllon, T., Rodriguez-Franco, F., Baneth, G., Calleja-Bueno, L., García-Sancho, M., Agulla, B., Sainz, A., 2017. Molecular detection of *Hepatozoon* spp. and *Cytauxzoon* sp. in domestic and stray cats from Madrid, Spain. *Parasit. Vectors* 10, 1.

Dobbelaere, D., Heussler, V., 1999. Transformation of leukocytes by *Theileria parva* and *T. annulata*. *Annual Reviews in Microbiology* 53, 1-42.

Dolan, T.T., 1989. Theileriasis: a comprehensive review. *Revue Scientifique et Technique, Office International des épizooties* 8, 11-78.

d'Oliveira, C., van der Weide, M., Habela, M.A., Jacquet, P., Jongejan, F., 1995. Detection of *Theileria annulata* in blood samples of carrier cattle by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 33, 2665-2669.

Donnelly, J., Peirce, M.A., 1975. Experiments on the transmission of *Babesia divergens* to cattle by the tick *Ixodes ricinus*. *Int. J. Parasitol.* 5, 363-367.

Doyle, R.L., França, R.T., Oliveira, C.B., Rezer, J.F., Klafke, G.M., Martins, J.R., Santos, A.P., do Nascimento, N.C., Mesick, J.B., Lopes, S.T., 2016. Cattle experimentally infected by *Anaplasma marginale*: Influence of splenectomy on disease pathogenesis, oxidative profile, and antioxidant status. *Microb. Pathog.* 95, 193-199.

Dreher, U.M., de la Fuente, J., Hofmann-Lehmann, R., Meli, M.L., Pusterla, N., Kocan, K.M., Woldehiwet, Z., Braun, U., Regula, G., Staerk, K.D., Lutz, H., 2005. Serologic cross-reactivity between *Anaplasma marginale* and *Anaplasma phagocytophilum*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 12, 1177-1183.

Dschunkowsky, E., Luhs, J., 1904. Die piroplasmosen der Rinder. Centralbl Bakteriell Parasitenk Infektion Hygiene 35, 486-493.

Dugat, T., Haciane, D., Durand, B., Lagrée, A., Haddad, N., Boulouis, H., 2017. Identification of a Potential Marker of *Anaplasma phagocytophilum* Associated with Cattle Abortion. Transboundary and emerging diseases 64, e3.

Dugat, T., Chastagner, A., Lagrée, A., Petit, E., Durand, B., Thierry, S., Corbière, F., Verheyden, H., Chabanne, L., Bailly, X., 2014. A new multiple-locus variable-number tandem repeat analysis reveals different clusters for *Anaplasma phagocytophilum* circulating in domestic and wild ruminants. Parasites & vectors 7, 439.

Dugat, T., Lagrée, A., Maillard, R., Boulouis, H., Haddad, N., 2015. Opening the black box of *Anaplasma phagocytophilum* diversity: current situation and future perspectives. Frontiers in cellular and infection microbiology 5, 61.

Dugat, T., Leblond, A., Keck, N., Lagrée, A., Desjardins, I., Joulié, A., Pradier, S., Durand, B., Boulouis, H., Haddad, N., 2017. One particular *Anaplasma phagocytophilum* ecotype infects cattle in the Camargue, France. Parasites & vectors 10, 371.

Duh, D., Petrovec, M., Bidovec, A., Avsic-Zupanc, T., 2005. Cervids as babesiae hosts, Slovenia. Emerging Infectious Diseases 11, 1121.

Dumler, J.S., Asanovich, K.M., Bakken, J.S., Richter, P., Kimsey, R., Madigan, J.E., 1995. Serologic cross-reactions among *Ehrlichia equi*, *Ehrlichia phagocytophila*, and human granulocytic *Ehrlichia*. J. Clin. Microbiol. 33, 1098-1103.

Dumler, J.S., Barbet, A.F., Bekker, C.P., Dasch, G.A., Palmer, G.H., Ray, S.C., Rikihisa, Y., Rurangirwa, F.R., 2001. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51, 2145-2165.

Dumler, J.S., Kyoung-Seong Choi, García-García, J., Barat, N.S., Scorpio, D.G., Garyu, J.W., Grab, D.J., Bakken, J.S., Choi, K., 2005. Human granulocytic anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum*. Emerging Infectious Diseases 11, 1828-1834.

Dumler, J.S., Madigan, J.E., Pusterla, N., Bakken, J.S., 2007. Ehrlichioses in humans: epidemiology, clinical presentation, diagnosis, and treatment. Clin. Infect. Dis. 45 Suppl 1, 45.

Dumler, J.S., Triggiani, E.R., Bakken, J.S., Aguero-Rosenfeld, M.E., Wormser, G.P., 2000. Serum cytokine responses during acute human granulocytic ehrlichiosis. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 7, 6-8.

Dunning Hotopp, J.C., Lin, M., Madupu, R., Crabtree, J., Angiuoli, S.V., Eisen, J., Seshadri, R., Ren, Q., Wu, M., Utterback, T.R., Smith, S., Lewis, M., Khouri, H., Zhang, C., Niu, H., Lin, Q., Ohashi, N., Zhi, N., Nelson, W., Brinkac, L.M., Dodson, R.J., Rosovitz, M.J., Sundaram, J., Daugherty, S.C., Davidsen, T., Durkin, A.S., Gwinn, M., Haft, D.H., Selengut, J.D., Sullivan, S.A., Zafar, N., Zhou, L., Benahmed, F., Forberger, H., Halpin, R., Mulligan, S., Robinson, J., White, O., Rikihisa, Y., Tettelin, H., 2006. Comparative Genomics of Emerging Human Ehrlichiosis Agents. PLOS Genetics 2, e21.

Dveksler, G.S., Basile, A.A., Dieffenbach, C.W., 1992. Analysis of gene expression: use of oligonucleotide primers for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Genome Res. 1, 283-285.

Eamens, G.J., Gonsalves, J.R., Jenkins, C., Collins, D., Bailey, G., 2013. *Theileria orientalis* MPSP types in Australian cattle herds associated with outbreaks of clinical disease and their association with clinical pathology findings. Vet. Parasitol. 191, 209-217.

Ebani, V.V., Rocchigiani, G., Nardoni, S., Bertelloni, F., Vasta, V., Papini, R.A., Verin, R., Poli, A., Mancianti, F., 2017. Molecular detection of tick-borne pathogens in wild red foxes (*Vulpes vulpes*) from Central Italy. Acta Trop. 172, 197-200.

Echaide, I.E., Hines, S.A., McElwain, T.F., Suarez, C.E., McGuire, T.C., Palmer, G.H., 1998. In vivo binding of immunoglobulin M to the surfaces of *Babesia bigemina*-infected erythrocytes. Infect. Immun. 66, 2922-2927.

Edelhofer, R., Kanout, A., Schuh, M., Kutzer, E., 1998. Improved disease resistance after *Babesia divergens* vaccination. Parasitol. Res. 84, 181-187.

Egeli, A.K., 1996. Babesiosis in a six-day-old calf. Vet. Rec. 139, 344-345.

- Elelu, N., Ferrolho, J., Couto, J., Domingos, A., Eisler, M.C., 2016. Molecular diagnosis of the tick-borne pathogen *Anaplasma marginale* in cattle blood samples from Nigeria using qPCR. *Exp. Appl. Acarol.* 70, 501-510.
- Enayati, A.A., Asgarian, F., Sharif, M., Boujhmehrani, H., Amouei, A., Vahedi, N., Boudaghi, B., Piazak, N., Hemingway, J., 2009. Propetamphos resistance in *Rhipicephalus bursa* (Acari, Ixodidae). *Vet. Parasitol.* 162, 135-141.
- Eriks, I.S., Stiller, D., Palmer, G.H., 1993. Impact of persistent *Anaplasma marginale* rickettsemia on tick infection and transmission. *J. Clin. Microbiol.* 31, 2091-2096.
- Estrada-Peña, A., Bouattour, A., Caminas, J.L., Walker, A.R., 2004. Ticks of Domestic Animals in the Mediterranean Region: A Guide to Identification of Species.
- Estrada-Peña, A., Farkas, R., Jaenson, T.G., Koenen, F., Madder, M., Pascucci, I., Salman, M., Tarres-Call, J., Jongejan, F., 2013. Association of environmental traits with the geographic ranges of ticks (Acari: Ixodidae) of medical and veterinary importance in the western Palearctic. A digital data set. *Exp. Appl. Acarol.* 59, 351-366.
- Estrada-Peña, A., Naranjo, V., Acevedo-Whitehouse, K., Mangold, A.J., Kocan, K.M., de la Fuente, J., 2009. Phylogeographic analysis reveals association of tick-borne pathogen, *Anaplasma marginale*, MSP1a sequences with ecological traits affecting tick vector performance. *BMC Biol.* 7, 57.
- Estrada-Peña, A., de la Fuente, J., 2014. The ecology of ticks and epidemiology of tick-borne viral diseases. *Antiviral Res.* 108, 104-128.
- Estrada-Peña, A., Santos-Silva, M., 2005. The distribution of ticks (Acari: Ixodidae) of domestic livestock in Portugal. *Exp. Appl. Acarol.* 36, 233-246.
- Estrada-Peña, A., 2001. Forecasting habitat suitability for ticks and prevention of tick-borne diseases. *Vet. Parasitol.* 98, 111-132.
- Eurostat, 2015. Meat production statistics. 2018.
- Evans, M.F., 2009. The polymerase chain reaction and pathology practice. *Diagnostic histopathology* 15, 344-356.
- Everitt, J.I., Shaddock, J.A., Steinkamp, C., Clabaugh, G., 1986. Experimental *Babesia bovis* infection in Holstein calves. *Vet. Pathol.* 23, 556-562.
- Eygelaar, D., Jori, F., Mokopasetso, M., Sibeko, K.P., Collins, N.E., Vorster, I., Troskie, M., Oosthuizen, M.C., 2015. Tick-borne haemoparasites in African buffalo (*Syncerus caffer*) from two wildlife areas in Northern Botswana. *Parasites & vectors* 8, 26.
- Feldman, B.F., Zinkl, J.G., Jain, N.C., 2000. *Shalm's veterinary hematology*. , 1075-1084.
- Fernández de Mera, I G, Ruiz-Fons, F., de la Fuente, G., Mangold, A.J., Gortázar, C., de la Fuente, J., 2013. Spotted fever group rickettsiae in questing ticks, central Spain. *Emerging Infectious Diseases* 19, 1163-1165.
- Figuerola Millán, J.V., Rojas Ramírez, E.E., Ramos Aragón, J.A., Granjeno Colín, G., García Ortiz, M.A., Canto Alarcón, G.J., Santiago Valencia, C., Parrodi, F., 1999. Evaluación en condiciones de campo de la vacuna inactivada de *Anaplasma marginale* denominada Plazvax. *Veterinaria México* 30.
- Figuerola, J.V., Precigout, E., Carcy, B., Gorenflot, A., 2006. Identification of common antigens in *Babesia bovis*, *B. bigemina*, and *B. divergens*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1081, 382-396.
- Figuerola, J.V., Chievas, L.P., Johnson, G.S., Buening, G.M., 1992. Detection of *Babesia bigemina* infected carriers by polymerase chain reaction amplification. *Journal of clinical microbiology* 30, 2576-2582.
- Foggie, A., 1951. Studies on the infectious agent of tick-borne fever in sheep. *J. Pathol.* 63, 1-15.
- Foley, J., Nieto, N.C., Madigan, J., Sykes, J., 2008. Possible differential host tropism in *Anaplasma phagocytophilum* strains in the Western United States. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1149, 94-97.
- Forsyth, L.M.G., Minns, F.C., Kirvar, E., Adamson, R.E., Hall, F.R., McOrist, S., Brown, C.G.D., Preston, P.M., 1999. Tissue Damage in Cattle Infected with *Theileria annulata* Accompanied by Metastasis of Cytokine-producing, Schizont-infected Mononuclear Phagocytes. *Journal of Comparative Pathology* 120, 39-57.



- French, D.M., Brown, W.C., Palmer, G.H., 1999. Emergence of *Anaplasma marginale* Antigenic Variants during Persistent Rickettsemia. *Infect. Immun.* 67, 5834-5840.
- French, D.M., McElwain, T.F., McGuire, T.C., Palmer, G.H., 1998. Expression of *Anaplasma marginale* Major Surface Protein 2 Variants during Persistent Cyclic Rickettsemia. *Infect. Immun.* 66, 1200-1207.
- Fritz, C.L., 2009. Emerging tick-borne diseases. *Vet. Clin. N. Am. : Small Anim. Pract.* 39, 265-278.
- Futse, J.E., Ueti, M.W., Knowles, D.P., Jr, Palmer, G.H., 2003. Transmission of *Anaplasma marginale* by *Boophilus microplus*: retention of vector competence in the absence of vector-pathogen interaction. *J. Clin. Microbiol.* 41, 3829-3834.
- Galindo, R.C., Ayllón, N., Smrdel, K.S., Boadella, M., Beltrán-Beck, B., Mazariegos, M., García, N., de la Lastra, José M Pérez, Avsic-Zupanc, T., Kocan, K.M., 2012. Gene expression profile suggests that pigs (*Sus scrofa*) are susceptible to *Anaplasma phagocytophilum* but control infection. *Parasites & vectors* 5, 181.
- Ganguly, A., Bhanot, V., Bisla, R.S., Ganguly, I., Singh, H., Chaudhri, S.S., 2015. Hematobiochemical alterations and direct blood polymerase chain reaction detection of *Theileria annulata* in naturally infected crossbred cows. *Vet. World* 8, 24-28.
- García-Fernández, P., Hueli, L.E., Viseras-Alarcón, J., 1996. Encuesta epizootiológica de la theileriosis bovina por *Theileria annulata* en el toro de lidia. *Medicina Veterinaria* 13, 348-352.
- García-García, J.C., de la Fuente, J., Blouin, E.F., Johnson, T.J., Halbur, T., Onet, V.C., Saliki, J.T., Kocan, K.M., 2004. Differential expression of the *msp1α* gene of *Anaplasma marginale* occurs in bovine erythrocytes and tick cells. *Vet. Microbiol.* 98, 261-272.
- García-Pérez, A.L., Barandika, J., Oporto, B., Povedano, I., Juste, R.A., 2003. *Anaplasma phagocytophila* as an abortifacient agent in sheep farms from northern Spain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 990, 429-432.
- García-Pérez, A.L., Oporto, B., Espi, A., del Cerro, A., Barral, M., Povedano, I., Barandika, J.F., Hurtado, A., 2016. Anaplasmataceae in wild ungulates and carnivores in northern Spain. *Ticks Tick Borne Dis.* 7, 264-269.
- García-Sanmartín, J., Aurtenetxe, O., Barral, M., Marco, I., Lavin, S., García-Pérez, A.L., Hurtado, A., 2007. Molecular detection and characterization of piroplasms infecting cervids and chamois in Northern Spain. *Parasitology* 134, 391-398.
- García-Sanmartín, J., Barandika, J.F., Juste, R.A., García-Pérez, A.L., Hurtado, A., 2008. Distribution and molecular detection of *Theileria* and *Babesia* in questing ticks from northern Spain. *Med. Vet. Entomol.* 22, 318-325.
- García-Sanmartín, J., Nagore, D., García-Pérez, A.L., Juste, R.A., Hurtado, A., 2006. Molecular diagnosis of *Theileria* and *Babesia* species infecting cattle in Northern Spain using reverse line blot macroarrays. *BMC Vet. Res.* 2, 16.
- Gauer, M., Mackenstedt, U., Mehlhorn, H., Schein, E., Zapf, F., Njenga, E., Young, A., Morzaria, S., 1995. DNA measurements and ploidy determination of developmental stages in the life cycles of *Theileria annulata* and *T. parva*. *Parasitol. Res.* 81, 565-574.
- Ge, N., Kocan, K.M., Blouin, E.F., Murphy, G.L., 1996. Developmental Studies of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in Male *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) Infected as Adults by Using Nonradioactive In Situ Hybridization and Microscopy. *J. Med. Entomol.* 33, 911-920.
- George, J.E., Pound, J.M., Davey, R.B., 2004. Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. *Parasitology* 129, S366.
- George, J.W., Snipes, J., Lane, V.M., 2010. Comparison of bovine hematology reference intervals from 1957 to 2006. *Vet. Clin. Pathol.* 39, 138-148.
- Georges, K., Loria, G.R., Riili, S., Greco, A., Caracappa, S., 2001. Detection of haemoparasites in cattle by reverse line blot hybridisation with a note on the distribution of ticks in Sicily. *Veterinary Parasitology* 99, 273-286.
- Gharbi, M., Sassi, L., Dorchies, P., Darghouth, M.A., 2006. Infection of calves with *Theileria annulata* in Tunisia: Economic analysis and evaluation of the potential benefit of vaccination. *Vet. Parasitol.* 137, 231-241.
- Gharbi, M., Darghouth, M.A., 2014. A review of *Hyalomma scupense* (Acari, Ixodidae) in the Maghreb region: from biology to control. *Parasite* 21, 1-12.

- Gharbi, M., Hayouni, M.E., Sassi, L., Dridi, W., Darghouth, M.A., 2013. *Hyalomma scupense* (Acari, Ixodidae) in northeast Tunisia: seasonal population dynamics of nymphs and adults on field cattle. *Parasite* 20, 12.
- Ghosh, S., Azhahianambi, P., de, I.F., 2006. Control of ticks of ruminants, with special emphasis on livestock farming systems in India: present and future possibilities for integrated control-a review. *Exp. Appl. Acarol.* 40, 49-66.
- Giadinis, N.D., Chochlakis, D., Ioannou, I., Kritsepi-Konstantinou, M., Papadopoulos, E., Psaroulaki, A., Karatzias, H., 2011. Haemorrhagic diathesis in a ram with *Anaplasma phagocytophilum* infection. *J. Comp. Pathol.* 144, 82-85.
- Gioia, G.V., Vinuela, R.L., Marsot, M., Devillers, E., Cruz, M., Petit, E., Boulouis, H.J., Moutailler, S., Monroy, F., Coello, M.A., Gondard, M., Bournez, L., Haddad, N., Zanella, G., 2018. Bovine anaplasmosis and tick-borne pathogens in cattle of the Galapagos Islands. *Transbound Emerg. Dis.*
- Glass, E.J., 2001. The balance between protective immunity and pathogenesis in tropical theileriosis: what we need to know to design effective vaccines for the future. *Res. Vet. Sci.* 70, 71-75.
- Glass, E.J., Crutchley, S., Jensen, K., 2012. Living with the enemy or uninvited guests: Functional genomics approaches to investigating host resistance or tolerance traits to a protozoan parasite, *Theileria annulata*, in cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 148, 178-189.
- Glass, E.J., Jensen, K., 2007. Resistance and susceptibility to a protozoan parasite of cattle—Gene expression differences in macrophages from different breeds of cattle. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 120, 20-30.
- Glass, E.J., Preston, P.M., Springbett, A., Craigmile, S., Kirvar, E., Wilkie, G., Brown, C.G.D., 2005. *Bos taurus* and *Bos indicus* (Sahiwal) calves respond differently to infection with *Theileria annulata* and produce markedly different levels of acute phase proteins. *Int. J. Parasitol.* 35, 337-347.
- Goff, W.L., Johnson, W.C., Molloy, J.B., Jorgensen, W.K., Waldron, S.J., Figueroa, J.V., Matthee, O., Adams, D.S., McGuire, T.C., Pino, I., 2008. Validation of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Babesia bigemina* antibodies in cattle. *Clinical and vaccine immunology* 15, 1316-1321.
- Gohil, S., Herrmann, S., Gunther, S., Cooke, B.M., 2013. Bovine babesiosis in the 21st century: advances in biology and functional genomics. *Int. J. Parasitol.* 43, 125-132.
- Gokce, H.I., Ross, G., Woldehiwet, Z., 1999. Inhibition of Phagosome-lysosome Fusion in Ovine Polymorphonuclear Leucocytes by *Ehrlichia* (Cytoecetes) phagocytophila. *J. Comp. Pathol.* 120, 369-381.
- Gomes, J., Soares, R., Santos, M., Santos-Gomes, G., Botelho, A., Amaro, A., Inacio, J., 2013. Detection of *Theileria* and *Babesia* infections amongst asymptomatic cattle in Portugal. *Ticks Tick Borne Dis.* 4, 148-151.
- Gonzalez Martín, J.V., Astiz Blanco, S., 2002. Piroplasmosis bovina: Patogenia. *Clinica y lesiones. Bovis* 108, 41-52.
- Goodman, J.L., Nelson, C., Vitale, B., Madigan, J.E., Dumler, J.S., Kurtti, T.J., Munderloh, U.G., 1996. Direct cultivation of the causative agent of human granulocytic ehrlichiosis. *N. Engl. J. Med.* 334, 209-215.
- Gordon, J.L., Sibley, L.D., 2005. Comparative genome analysis reveals a conserved family of actin-like proteins in apicomplexan parasites. *BMC Genomics* 6, 179.
- Gorenflot, A., Brasseur, P., Precigout, E., L'hostis, M., Marchand, A., Schrevel, J., 1991. Cytological and immunological responses to *Babesia divergens* in different hosts: Ox, gerbil, man. *Parasitol. Res.* 77, 3-12.
- Gorenflot, A., Precigout, E., Bissuel, G., Lecointre, O., Brasseur, P., Vidor, E., L'Hostis, M., Schrevel, J., 1990. Identification of major *Babesia divergens* polypeptides that induce protection against homologous challenge in gerbils. *Infect. Immun.* 58, 4076-4082.
- Gortázar, C., Fernández-Calle, L.M., Collazos-Martínez, J.A., Mínguez-González, O., Acevedo, P., 2017. Animal tuberculosis maintenance at low abundance of suitable wildlife reservoir hosts: A case study in northern Spain. *Prev. Vet. Med.* 146, 150-157.
- Gortázar, C., Ferroglio, E., Höfle, U., Frölich, K., Vicente, J., 2007. Diseases shared between wildlife and livestock: a European perspective. *European Journal of Wildlife Research* 53, 241.



- Gortázar, C., Torres, M.J., Vicente, J., Acevedo, P., Reglero, M., De la Fuente, J., Negro, J.J., Aznar-Martín, J., 2008. Bovine tuberculosis in Donana Biosphere Reserve: the role of wild ungulates as disease reservoirs in the last Iberian lynx strongholds. *PLoS one* 3, e2776.
- Gough, J.M., Jorgensen, W.K., Kemp, D.H., 1998. Development of tick gut forms of *Babesia bigemina* in vitro. *J. Eukaryot. Microbiol.* 45, 298-306.
- GPS Tools PEGI 3, 2015. Mis Coordenadas GPS. 1.74.
- Graham, S.P., Brown, D.J., Vatansever, Z., Waddington, D., Taylor, L.H., Nichani, A.K., Campbell, J.D.M., Adamson, R.E., Glass, E.J., Spooner, R.L., 2001. Proinflammatory cytokine expression by *Theileria annulata* infected cell lines correlates with the pathology they cause in vivo. *Vaccine* 19, 2932-2944.
- Grande, N., Precigout, E., Ancelin, M.L., Moubri, K., Carcy, B., Lemesre, J.L., Vial, H., Gorenflot, A., 1997. Continuous in vitro culture of *Babesia divergens* in a serum-free medium. *Parasitology* 115, 81-89.
- Granquist, E.G., Aleksandersen, M., Bergstrom, K., Dumler, S.J., Torsteinbo, W.O., Stuen, S., 2010. A morphological and molecular study of *Anaplasma phagocytophilum* transmission events at the time of *Ixodes ricinus* tick bite. *Acta Vet. Scand.* 52, 43.
- Granquist, E.G., Stuen, S., Crosby, L., Lundgren, A.M., Alleman, A.R., Barbet, A.F., 2010. Variant-specific and diminishing immune responses towards the highly variable MSP2 (P44) outer membrane protein of *Anaplasma phagocytophilum* during persistent infection in lambs. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 133, 117-124.
- Grau, H.E., Cunha Filho, N.A., Pappen, F.G., Farias, N.A., 2013. Transplacental transmission of *Anaplasma marginale* in beef cattle chronically infected in southern Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 22, 189-193.
- Gray, J.S., 2004. *Babesia* sp.: emerging intracellular parasites in Europe. *Pol J Microbiol* 53, 55-60.
- Gray, J.S., De Vos, A.J., 1981. Studies on a bovine *Babesia* transmitted by *Hyalomma marginatum rufipes* Koch, 1844. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 48, 215-223.
- Gray, J.S., Kaye, B., 1991. Studies on the use of gerbil-derived *Babesia divergens* antigen for diagnosis of bovine babesiosis. *Vet. Parasitol.* 39, 215-224.
- Gray, J.S., Murphy, T.M., Waldrup, K.A., Wagner, G.G., Blewett, D.A., Harrington, R., 1991. Comparative studies of *Babesia* spp. from white-tailed and sika deer. *J. Wildl. Dis.* 27, 86-91.
- Grech-Angelini, S., Stachurski, F., Lancelot, R., Boissier, J., Allienne, J., Gharbi, M., Uilenberg, G., 2016. First report of the tick *Hyalomma scupense* (natural vector of bovine tropical theileriosis) on the French Mediterranean island of Corsica. *Vet. Parasitol.* 216, 33-37.
- Grøva, L., Olesen, I., Steinshamn, H., Stuen, S., 2013. The effect of lamb age to a natural *Anaplasma phagocytophilum* infection. *Small ruminant research* 112, 208-215.
- Grøva, L., Olesen, I., Steinshamn, H., Stuen, S., 2011. Prevalence of *Anaplasma phagocytophilum* infection and effect on lamb growth. *Acta Vet. Scand.* 53, 30.
- Gubbels, J.M., de Vos, A.P., van der Weide, M., Viseras, J., Schouls, L.M., de Vries, E., Jongejan, F., 1999. Simultaneous detection of bovine *Theileria* and *Babesia* species by reverse line blot hybridization. *J Clin Microbiol.* 37, 1782-1789.
- Gubbels, M., d'Oliveira, C., Jongejan, F., 2000. Development of an indirect Tams1 enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Theileria annulata* infection in cattle. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 7, 404-411.
- Guerrero Espejo, A., Munoz Parada, C., Tomas Dols, S., 2017. Incidence of human babesiosis in Spain obtained from the diagnoses at hospital discharge. *Med. Clin. (Barc)* 149, 84-85.
- Guglielmone, A.A., 1995. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Vet. Parasitol.* 57, 109-119.
- Guglielmone, A.A., Aguirre, D.H., Späth, E.J.A., Gaido, A.B., Mangold, A.J., de Ríos, L.G., 1992. Long-term study of incidence and financial loss due to cattle babesiosis in an Argentinian dairy farm. *Preventive Veterinary Medicine* 12, 307-312.
- Gupta, A., Gupta, K., Leishangthem, G.D., Bal, M.S., Sood, N.K., Singh, A., 2016. Molecular and pathological studies on natural cases of bovine theileriosis. *Journal of Parasitic Diseases* 41, 211-218.

- Guyot, H., Ramery, E., O'Grady, L., Sandersen, C., Rollin, F., 2011. Emergence of bovine ehrlichiosis in Belgian cattle herds. *Ticks Tick Borne Dis.* 2, 116-118.
- Habela, M.A., Corchero, E., Pena, J., Sevilla, R.G., 2002. Epidemiología de la Theileriosis y Babesiosis bovinas. *Bovis* 108, 29-40.
- Habela, M., Rol, J.A., Anton, J.M., Pena, J., Corchero, E., van Ham, I., Jongejan, E., 1999. Epidemiology of Mediterranean theileriosis in Extremadura region, Spain. *Parassitologia* 41 Suppl 1, 47-51.
- Hadj-Kaddour, K., Carcy, B., Vallet, A., Randazzo, S., Delbec, S., 2007. Recombinant protein Bd37 protected gerbils against heterologous challenges with isolates of *Babesia divergens* polymorphic for the bd37 gene. *Parasitology* 134, 187-196.
- Han, S., Norimine, J., Brayton, K.A., Palmer, G.H., Scoles, G.A., Brown, W.C., 2010. *Anaplasma marginale* infection with persistent high-load bacteremia induces a dysfunctional memory CD4 T lymphocyte response but sustained high IgG titers. *Clinical and Vaccine Immunology* 17, 1881-1890.
- Hansen, M.G., Christoffersen, M., Thuesen, L.R., Petersen, M.R., Bojesen, A.M., 2010. Seroprevalence of *Borrelia burgdorferi sensu lato* and *Anaplasma phagocytophilum* in Danish horses. *Acta Vet. Scand.* 52, 3.
- Hein, W.R., Mackay, C.R., 1991. Prominence of  $\gamma\delta$  T cells in the ruminant immune system. *Immunol. Today* 12, 30-34.
- Henniger, T., Henniger, P., Grossmann, T., Distl, O., Ganter, M., von Loewenich, F.D., 2013. Congenital infection with *Anaplasma phagocytophilum* in a calf in northern Germany. *Acta Vet. Scand.* 55, 38.
- Herndon, D.R., Palmer, G.H., Shkap, V., Knowles, D.P., Brayton, K.A., 2010. Complete genome sequence of *Anaplasma marginale* subsp. *centrale*. *J. Bacteriol.* 192, 379-380.
- Herndon, D.R., Ueti, M.W., Reif, K.E., Noh, S.M., Brayton, K.A., Agnes, J.T., Palmer, G.H., 2013. Identification of multilocus genetic heterogeneity in *Anaplasma marginale* subsp. *centrale* and its restriction following tick-borne transmission. *Infect. Immun.* 81, 1852-1858.
- Herron, M.J., Ericson, M.E., Kurtti, T.J., Munderloh, U.G., 2005. The interactions of *Anaplasma phagocytophilum*, endothelial cells, and human neutrophils. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1063, 374-382.
- Hildebrandt, A., Franke, J., Meier, F., Sachse, S., Dorn, W., Straube, E., 2010. The potential role of migratory birds in transmission cycles of *Babesia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, and *Rickettsia* spp. *Ticks Tick Borne Dis.* 1, 105-107.
- Hildebrandt, A., Gray, J.S., Hunfeld, K., 2013. Human babesiosis in Europe: what clinicians need to know. *Infection* 41, 1057-1072.
- Hilpertshauser, H., Deplazes, P., Meli, M.L., Hofmann-Lehmann, R., Lutz, H., Mathis, A., 2007. Genotyping of *Babesia bigemina* from cattle from a non-endemic area (Switzerland). *Vet. Parasitol.* 145, 59-64.
- Hoby, S., Robert, N., Mathis, A., Schmid, N., Meli, M.L., Hofmann-Lehmann, R., Lutz, H., Deplazes, P., Ryser-Degiorgis, M., 2007. Babesiosis in free-ranging chamois (*Rupicapra r. rupicapra*) from Switzerland. *Vet. Parasitol.* 148, 341-345.
- Hodgson, J.L., 1992. Biology and transmission of *Babesia bigemina* in *Boophilus microplus*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 653, 42-51.
- Hofmann-Lehmann, R., Meli, M.L., Dreher, U.M., Gönczi, E., Deplazes, P., Braun, U., Engels, M., Schüpbach, J., Jörger, K., Thoma, R., Griot, C., Stärk, K.D.C., Willi, B., Schmidt, J., Kocan, K.M., Lutz, H., 2004. Concurrent infections with Vector-Borne Pathogens Associated with Fatal Hemolytic Anemia in a Cattle Herd in Switzerland. *Journal of clinical microbiology* 42, 3775-3780.
- Holman, P.J., Carroll, J.E., Pugh, R., Davis, D.S., 2011. Molecular detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) from Tom Green County in central Texas. *Vet. Parasitol.* 177, 298-304.
- Holman, P.J., Spencer, A.M., Telford, S.R., 3rd, Goethert, H.K., Allen, A.J., Knowles, D.P., Goff, W.L., 2005. Comparative infectivity of *Babesia divergens* and a zoonotic *Babesia divergens*-like parasite in cattle. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 73, 865-870.

- Homer, M.J., Aguilar-Delfin, I., Telford, S.R., Krause, P.J., Persing, D.H., 2000. Babesiosis. *Clinical Microbiology Reviews* 13, 451–469.
- Hornok, S., Edelhofer, R., Szotáczky, I., Hajtós, I., 2006. *Babesia divergens* becoming extinct in cattle of Northeast Hungary: new data on the past and present situation. *Acta Vet. Hung.* 54, 493-501.
- Hosseini-Vasoukolaei, N., Oshaghi, M.A., Shayan, P., Vatandoost, H., Babamahmoudi, F., Yaghoobi-Ershadi, M.R., Telmadarraiy, Z., Mohtarami, F., 2014. Anaplasma infection in ticks, livestock and human in Ghaemshahr, Mazandaran Province, Iran. *Journal of arthropod-borne diseases* 8, 204.
- Hove, P., Khumalo, Z.T., Chaisi, M.E., Oosthuizen, M.C., Brayton, K.A., Collins, N.E., 2018. Detection and Characterisation of *Anaplasma marginale* and *A. centrale* in South Africa. *Veterinary sciences* 5, 26.
- Howell, J.M., Ueti, M.W., Palmer, G.H., Scoles, G.A., Knowles, D.P., 2007. Persistently infected calves as reservoirs for acquisition and transovarial transmission of *Babesia bovis* by *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *J. Clin. Microbiol.* 45, 3155-3159.
- Hudson, J.R., 1950. The recognition of tick-borne fever as a disease of cattle. *Br. Vet. J.* 106, 3-17.
- Hunfeld, K.P., Hildebrandt, A., Gray, J.S., 2008. Babesiosis: recent insights into an ancient disease. *Int. J. Parasitol.* 38, 1219-1237.
- Hurtado Preciado, M A, Serrano Fraile, L.A., 2013. Brote agudo de anaplasmosis bovina en Cáceres (Extremadura), España. XVIII Congreso Internacional ANEMBE de Medicina Bovina 1, 165-167.
- Ijdo, J.W., Sun, W., Zhang, Y., Magnarelli, L.A., Fikrig, E., 1998. Cloning of the gene encoding the 44-kilodalton antigen of the agent of human granulocytic ehrlichiosis and characterization of the humoral response. *Infect. Immun.* 66, 3264-3269.
- INE, 2009. Instituto Nacional de Estadística. 2014.
- Inokuma, H., Terada, Y., Kamio, T., Raoult, D., Brouqui, P., 2001. Analysis of the 16S rRNA gene sequence of *Anaplasma centrale* and its phylogenetic relatedness to other ehrlichiae. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 8, 241-244.
- Jackson, A.P., Otto, T.D., Darby, A., Ramaprasad, A., Xia, D., Echaide, I.E., Farber, M., Gahlot, S., Gamble, J., Gupta, D., Gupta, Y., Jackson, L., Malandrin, L., Malas, T.B., Moussa, E., Nair, M., Reid, A.J., Sanders, M., Sharma, J., Tracey, A., Quail, M.A., Weir, W., Wastling, J.M., Hall, N., Willadsen, P., Lingelbach, K., Shiels, B., Tait, A., Berriman, M., Allred, D.R., Pain, A., 2014. The evolutionary dynamics of variant antigen genes in *Babesia* reveal a history of genomic innovation underlying host-parasite interaction. *Nucleic Acids Res.* 42, 7113-7131.
- Jacquiet, P., Dia, M.L., Perié, N.M., Jongejan, F., Uilenberg, G., Morel, P., 1990. Présence de *Theileria annulata* en Mauritanie. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux* 43, 489-490.
- Jaimes-Duenez, J., Triana-Chavez, O., Mejia-Jaramillo, A.M., 2017. Parasitological and molecular surveys reveal high rates of infection with vector-borne pathogens and clinical anemia signs associated with infection in cattle from two important livestock areas in Colombia. *Ticks Tick Borne Dis.* 8, 290-299.
- Jensen, K., Paxton, E., Waddington, D., Talbot, R., Darghouth, M.A., Glass, E.J., 2008. Differences in the transcriptional responses induced by *Theileria annulata* infection in bovine monocytes derived from resistant and susceptible cattle breeds. *Int. J. Parasitol.* 38, 313-325.
- Jones, K.E., Patel, N.G., Levy, M.A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J.L., Daszak, P., 2008. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451, 990.
- Jongejan, F., Uilenberg, G., 2004. The global importance of ticks. *Parasitology* 129 Suppl, 3-14.
- Jonsson, N.N., Bock, R.E., Jorgensen, W.K., 2008. Productivity and health effects of anaplasmosis and babesiosis on *Bos indicus* cattle and their crosses, and the effects of differing intensity of tick control in Australia. *Vet Parasitol.* 1, 1-9.
- Jorgensen, W.K., Bock, R.E., Kingston, T.G., de Vos, A.J., Waldron, S.J., 1993. Assessment of tetracycline and *Babesia* culture supernatant as prophylactics for moderating reactions in cattle to live *Babesia* and *Anaplasma* vaccines. *Aust. Vet. J.* 70, 35-36.
- Jorgensen, W.K., Waldron, S.J., Mc Grath, J., Roman, R.J., De Vos, A.J., Williams, K.E., 1992. Growth of *Babesia bigemina* parasites in suspension cultures for vaccine production. *Parasitol. Res.* 78, 423-426.

- Joyner, L.P., Davies, S., 1967. Acquired resistance to *Babesia divergens* in experimental calves. *J. Protozool.* 14, 260-262.
- Juste Jordan, R.A., García Pérez, A.L., Povedano Fernandez, J., 1986. Experimental studies of pathogenic agents transmitted by ticks (*Babesia*, *Theileria*, *Cytoecetes* and *Anaplasma*) in sheep of the Basque Country. *Medicina Veterinaria (Spain)* 9, 431-439.
- Juste, R.A., Scott, G.R., Paxton, E.A., Gelabert, J.L., Jimenez, S., 1989. Presence of *Cytoecetes phagocytophila* in an atypical disease of cattle in Spain. *Vet. Rec.* 124, 636.
- Kalantarpour, F., Chowdhury, I., Wormser, G.P., Aguero-Rosenfeld, M.E., 2000. Survival of the human granulocytic ehrlichiosis agent under refrigeration conditions. *J. Clin. Microbiol.* 38, 2398-2399.
- Kang, Y., Diao, X., Zhao, G., Chen, M., Xiong, Y., Shi, M., Fu, W., Guo, Y., Pan, B., Chen, X., 2014. Extensive diversity of Rickettsiales bacteria in two species of ticks from China and the evolution of the Rickettsiales. *BMC evolutionary biology* 14, 167.
- Katargina, O., Geller, J., Alekseev, A., Dubinina, H., Efremova, G., Mishaeva, N., Vasilenko, V., Kuznetsova, T., Järvekülg, L., Vene, S., 2012. Identification of *Anaplasma phagocytophilum* in tick populations in Estonia, the European part of Russia and Belarus. *Clinical Microbiology and Infection* 18, 40-46.
- Kawahara, M., Rikihisa, Y., Lin, Q., Isogai, E., Tahara, K., Itagaki, A., Hiramitsu, Y., Tajima, T., 2006. Novel genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum*, *Anaplasma bovis*, *Anaplasma centrale*, and a novel *Ehrlichia* sp. in wild deer and ticks on two major islands in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1102-1109.
- Keel, M.K., Goff, W.L., Davidson, W.R., 1995. An assessment of the role of white-tailed deer in the epizootiology of anaplasmosis in the southeastern United States. *J. Wildl. Dis.* 31, 378-385.
- Khumalo, Z.T., Brayton, K.A., Collins, N.E., Chaisi, M.E., Quan, M., Oosthuizen, M.C., 2018. Evidence confirming the phylogenetic position of *Anaplasma centrale* (ex Theiler 1911) Ristic and Kreier 1984. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*
- Khumalo, Z.T., Catanese, H.N., Liesching, N., Hove, P., Collins, N.E., Chaisi, M.E., Gebremedhin, A.H., Oosthuizen, M.C., Brayton, K.A., 2016. Characterization of *Anaplasma marginale* subsp. *centrale* strains by use of *msp1a*S genotyping reveals a wildlife reservoir. *J. Clin. Microbiol.* 54, 2503-2512.
- Kieser, S.T., Eriks, I.S., Palmer, G.H., 1990. Cyclic rickettsemia during persistent *Anaplasma marginale* infection of cattle. *Infect. Immun.* 58, 1117-1119.
- Kjemtrup, A.M., Conrad, P.A., 2000. Human babesiosis: an emerging tick-borne disease. *Int. J. Parasitol.* 30, 1323-1337.
- Kjemtrup, A.M., Thomford, J., Robinson, T., Conrad, P.A., 2000. Phylogenetic relationships of human and wildlife piroplasm isolates in the western United States inferred from the 18S nuclear small subunit RNA gene. *Parasitology* 120 ( Pt 5), 487-493.
- Kjemtrup, A.M., Wainwright, K., Miller, M., Penzhorn, B.L., Carreno, R.A., 2006. *Babesia conradae*, sp. nov., a small canine *Babesia* identified in California. *Vet. Parasitol.* 138, 103-111.
- Kocan, K.M., Blouin, E.F., Barbet, A.F., 2000. Anaplasmosis control. Past, present, and future. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 916, 501-509.
- Kocan, K.M., Busby, A.T., Allison, R.W., Breshears, M.A., Coburn, L., Galindo, R.C., Ayllon, N., Blouin, E.F., de la Fuente, J., 2012. Sheep experimentally infected with a human isolate of *Anaplasma phagocytophilum* serve as a host for infection of *Ixodes scapularis* ticks. *Ticks Tick Borne Dis.* 3, 147-153.
- Kocan, K.M., de la Fuente, J., Cabezas-Cruz, A., 2015. The genus *Anaplasma*: new challenges after reclassification. *Rev. Sci. Tech.* 34, 577-586.
- Kocan, K.M., de la Fuente, J., Step, D.L., Blouin, E.F., Coetzee, J.F., Simpson, K.M., Genova, S.G., Boileau, M.J., 2010. Current challenges of the management and epidemiology of bovine anaplasmosis. *Bovine Practitioner* 44, 93.
- Kocan, K.M., Goff, W.L., Stiller, D., Claypool, P.L., Edwards, W., Ewing, S.A., Hair, J.A., Barron, S.J., 1992. Persistence of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in male *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) transferred successively from infected to susceptible calves. *J. Med. Entomol.* 29, 657-668.

- Kocan, K.M., Golsteyn Thomas, E.J., Bussche, R.A., Hamilton, R.G., Tanaka, E.E., Druhan, S.E., 2004. Recent studies on the characterization of *Anaplasma marginale* isolated from North American bison. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1026, 114-117.
- Kocan, K.M., Halbur, T., Blouin, E.F., Onet, V., de la Fuente, J., García-García, J.C., Saliki, J.T., 2001. Immunization of cattle with *Anaplasma marginale* derived from tick cell culture. *Vet. Parasitol.* 102, 151-161.
- Kocan, K., de la Fuente, J., Blouin, E.F., García-García, J., 2004. *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae): recent advances in defining host-pathogen adaptations of a tick-borne Rickettsia. *Paraditology* 129 Suppl, 285.
- Kocan, K.M., de la Fuente, J., 2003. Co-feeding studies of ticks infected with *Anaplasma marginale*. *Vet. Parasitol.* 112, 295-305.
- Kocan, K.M., de la Fuente, J., Blouin, E.F., Coetzee, J.F., Ewing, S.A., 2010. The natural history of *Anaplasma marginale*. *Vet. Parasitol.* 167, 95-107.
- Kocan, K.M., Fuente, J.d.l., Guglielmone, A.A., Meléndez, R.D., 2003. Antigens and Alternatives for Control of *Anaplasma marginale* Infection in Cattle. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 698-712.
- Kolte, S.W., Larcombe, S.D., Jadhao, S.G., Magar, S.P., Warthi, G., Kurkure, N.V., Glass, E.J., Shiels, B.R., 2017. PCR diagnosis of tick-borne pathogens in Maharashtra state, India indicates fitness cost associated with carrier infections is greater for crossbreed than native cattle breeds. *PLoS One* 12, e0174595.
- Kuttler, K.L., 1984. *Anaplasma* infections in wild and domestic ruminants: a review. *J. Wildl. Dis.* 20, 12-20.
- Kuttler, K.L., Zaugg, J.L., 1988. Characteristics of an attenuated *Anaplasma marginale* of deer origin as an anaplasmosis vaccine. *Trop. Anim. Health Prod.* 20, 85-91.
- Laloy, E., Petit, E., Boulouis, H., Gandoin, C., Bouillan, C., Gounot, G., Bonnet, S., Maillard, R., 2009. Dynamics of natural infection by *Anaplasma phagocytophilum* in a dairy cattle herd in Brittany, France. *Clinical Microbiology and Infection* 15, 24-25.
- Langton, C., Gray, J., Waters, P., Holman, P., 2003. Naturally acquired babesiosis in a reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) herd in Great Britain. *Parasitol. Res.* 89, 194-198.
- Latif, B., Said, M.S., Ali, S.R., 1979. Effect of age on the immune response of cattle experimentally infected with *Babesia bigemina*. *Vet. Parasitol.* 5, 307-314.
- Lee, H.C., Kioi, M., Han, J., Puri, R.K., Goodman, J.L., 2008. *Anaplasma phagocytophilum*-induced gene expression in both human neutrophils and HL-60 cells. *Genomics* 92, 144-151.
- Lepidi, H., Bunnell, J.E., Martín, M.E., Madigan, J.E., Stuenkel, S., Dumler, J.S., 2000. Comparative pathology, and immunohistology associated with clinical illness after Ehrlichia phagocytophila-group infections. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 62, 29-37.
- Levine, N.D., 1971. Taxonomy of Piroplasms. *Transactions of the American Microscopical Society* 90, 2-33.
- Lew, A.E., Bock, R.E., Minchin, C.M., Masaka, S., 2002. A msp1alpha polymerase chain reaction assay for specific detection and differentiation of *Anaplasma marginale* isolates. *Vet. Microbiol.* 86, 325-335.
- L'Hostis, M., Chauvin, A., 1999. *Babesia divergens* in France: descriptive and analytical epidemiology. *Parasitologia* 41 Suppl 1, 59-62.
- L'Hostis, M., Seegers, H., 2002. Tick-borne parasitic diseases in cattle: current knowledge and prospective risk analysis related to the ongoing evolution in French cattle farming systems. *Vet. Res.* 33, 599-611.
- Li, H., Zheng, Y.C., Ma, L., Jia, N., Jiang, B.G., Jiang, R.R., Huo, Q.B., Wang, Y.W., Liu, H.B., Chu, Y.L., Song, Y.D., Yao, N.N., Sun, T., Zeng, F.Y., Dumler, J.S., Jiang, J.F., Cao, W.C., 2015. Human infection with a novel tick-borne *Anaplasma* species in China: a surveillance study. *Lancet Infect. Dis.* 15, 663-670.
- Li, H., Zheng, Y., Ma, L., Jia, N., Jiang, B., Jiang, R., Huo, Q., Wang, Y., Liu, H., Chu, Y., Song, Y., Yao, N., Sun, T., Zeng, F., Dumler, J.S., Jiang, J., Cao, W., 2015. Human infection with a novel tick-borne *Anaplasma* species in China: a surveillance study. *The Lancet Infectious Diseases* 15, 663-670.
- Li, Y., Chen, Z., Liu, Z., Liu, J., Yang, J., Li, Q., Li, Y., Ren, Q., Niu, Q., Guan, G., 2014. First report of Theileria and *Anaplasma* in the Mongolian gazelle, *Procapra gutturosa*. *Parasites & vectors* 7, 614.

- Lin, M., Rikihisa, Y., 2003. *Ehrlichia chaffeensis* and *Anaplasma phagocytophilum* lack genes for lipid A biosynthesis and incorporate cholesterol for their survival. *Infect. Immun.* 71, 5324-5331.
- Lindgren, E., Tälleklint, L., Polfeldt, T., 2000. Impact of climatic change on the northern latitude limit and population density of the disease-transmitting European tick *Ixodes ricinus*. *Environ. Health Perspect.* 108, 119.
- Liu, A., Guan, G., Liu, Z., Liu, J., Leblanc, N., Li, Y., Gao, J., Ma, M., Niu, Q., Ren, Q., 2010. Detecting and differentiating *Theileria sergenti* and *Theileria sinensis* in cattle and yaks by PCR based on major piroplasm surface protein (MPSP). *Exp. Parasitol.* 126, 476-481.
- Liu, J., Guan, G., Liu, Z., Liu, A., Ma, M., Bai, Q., Yin, H., Luo, J., 2013. Additional data for a new *Theileria* sp. from China based on the sequences of ribosomal RNA internal transcribed spacers. *Exp. Parasitol.* 133, 217-221.
- Liu, Z., Ma, M., Wang, Z., Wang, J., Peng, Y., Li, Y., Guan, G., Luo, J., Yin, H., 2011. Molecular Survey and Genetic Identification of *Anaplasma* Species in Goats from Central and Southern China. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 464-470.
- Liu, Z., Zhao, J., Ma, L., Yao, B., 1997. Studies on buffalo babesiosis in Hubei Province, China. *Trop. Anim. Health Prod.* 29, 36S.
- Liz, J.S., 2002. Ehrlichiosis in *Ixodes ricinus* and wild mammals. *International Journal of Medical Microbiology* 291, 104-105.
- Liz, J.S., Anderes, L., Sumner, J.W., Massung, R.F., Gern, L., Rutti, B., Brossard, M., 2000. PCR detection of granulocytic ehrlichiae in *Ixodes ricinus* ticks and wild small mammals in western Switzerland. *J. Clin. Microbiol.* 38, 1002-1007.
- Luo, J., Yin, H., Guan, G., Yang, D., Liu, A., Ma, M., Liu, Z., Dang, Z., Liu, G., Bai, Q., 2005. A comparison of small-subunit ribosomal RNA gene sequences of bovine *Babesia* species transmitted by *Haemaphysalis* spp. in China. *Parasitol. Res.* 95, 145-149.
- MacHugh, N.D., Weir, W., Burrells, A., Lizundia, R., Graham, S.P., Taracha, E.L., Shiels, B.R., Langsley, G., Morrison, W.I., 2011. Extensive polymorphism and evidence of immune selection in a highly dominant antigen recognized by bovine CD8 T cells specific for *Theileria annulata*. *Infect. Immun.* 79, 2059-2069.
- Mackenstedt, U., Gauer, M., Fuchs, P., Zapf, F., Schein, E., Mehlhorn, H., 1995. DNA measurements reveal differences in the life cycles of *Babesia bigemina* and *B. canis*, two typical members of the genus *Babesia*. *Parasitol. Res.* 81, 595-604.
- Mackenstedt, U., Gauer, M., Mehlhorn, H., Schein, E., Hauschild, S., 1990. Sexual cycle of *Babesia divergens* confirmed by DNA measurements. *Parasitol. Res.* 76, 199-206.
- MacLeod, J., Gordon, W.S., 1933. Studies in tick-borne fever of sheep. I. Transmission by the tick, *Ixodes ricinus*, with a description of the disease produced. *Parasitology* 25, 273-283.
- Madrugá, C.R., Suarez, C.E., McElwain, T.F., Palmer, G.H., 1996. Conservation of merozoite membrane and apical complex B cell epitopes among *Babesia bigemina* and *Babesia bovis* strains isolated in Brazil. *Vet. Parasitol.* 61, 21-30.
- Mans, B.J., Pienaar, R., Latif, A.A., 2015. A review of *Theileria* diagnostics and epidemiology. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife* 4, 104-118.
- Marcelino, I., de Almeida, A.M., Ventosa, M., Pruneau, L., Meyer, D.F., Martínez, D., Lefrançois, T., Vachieri, N., Coelho, A.V., 2012. Tick-borne diseases in cattle: applications of proteomics to develop new generation vaccines. *J. Proteomics* 75, 4232-4250.
- Martín-Sánchez, J., García-Fernández, P., 1999. *Theileria annulata*: Genetic characterization of Spanish isolates by isoenzyme electrophoresis and random amplified polymorphic DNA. *Exp. Parasitol.* 92, 57-63.
- Martín-Sánchez, J., Viseras, J., Adroher, F.J., García-Fernández, P., 1999. Nested polymerase chain reaction for detection of *Theileria annulata* and comparison with conventional diagnostic techniques: its use in epidemiology studies. *Parasitol. Res.* 85, 243-245.
- Massung, R.F., Slater, K.G., 2003. Comparison of PCR assays for detection of the agent of human granulocytic ehrlichiosis, *Anaplasma phagocytophilum*. *J. Clin. Microbiol.* 41, 717-722.



- Massung, R.F., Courtney, J.W., Hiratzka, S.L., Pitzer, V.E., Smith, G., Dryden, R.L., 2005. *Anaplasma phagocytophilum* in white-tailed deer. *Emerging infectious diseases* 11, 1604.
- Massung, R.F., Mather, T.N., Levin, M.L., 2006. Reservoir competency of goats for the Ap-variant 1 strain of *Anaplasma phagocytophilum*. *Infect. Immun.* 74, 1373-1375.
- Massung, R.F., Mauel, M.J., Owens, J.H., Allan, N., Courtney, J.W., Stafford III, K.C., Mather, T.N., 2002. Genetic variants of *Ehrlichia phagocytophila*, Rhode island and Connecticut. *Emerging Infectious Diseases* 8, 467.
- Massung, R.F., Priestley, R.A., Miller, N.J., Mather, T.N., Levin, M.L., 2003. Inability of a variant strain of *Anaplasma phagocytophilum* to infect mice. *J. Infect. Dis.* 188, 1757-1763.
- McGarey, D.J., Allred, D.R., 1994. Characterization of hemagglutinating components on the *Anaplasma marginale* initial body surface and identification of possible adhesins. *Infect. Immun.* 62, 4587-4593.
- McGarey, D.J., Barbet, A.F., Palmer, G.H., McGuire, T.C., Allred, D.R., 1994. Putative adhesins of *Anaplasma marginale*: major surface polypeptides 1a and 1b. *Infect. Immun.* 62, 4594-4601.
- McLeod, R., Kristjanson, P., 1999. Economic impact of ticks and tick-borne diseases to livestock in Africa, Asia and Australia. Report to the International Livestock Research Institute, Nairobi, Kenya .
- Mehlhorn, H., Shein, E., 1984. The piroplasms: life cycle and sexual stages. *Adv. Parasitol.* 23, 37-103.
- Melendez, R.D., Toro Benitez, M., Niccita, G., Moreno, J., Puzzar, S., Morales, J., 2003. Humoral immune response and hematologic evaluation of pregnant Jersey cows after vaccination with *Anaplasma centrale*. *Vet. Microbiol.* 94, 335-339.
- Merino, F.J., Nebreda, T., Serrano, J.L., Fernandez-Soto, P., Encinas, A., Pérez-Sánchez, R., 2005. Tick species and tick-borne infections identified in population from a rural area of Spain. *Epidemiol. Infect.* 133, 943-949.
- MeteoGroup, 2010. WeatherPro. 4.8.8.4.
- Meyer, D.J., Harvey, J.W., 2004. *Veterinary Laboratory Medicine: Interpretation and Diagnosis*.
- M'Fadyean, J., Stockman, S., 1911. A new species of piroplasm found in the blood of British cattle. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics* 24, 340-354.
- Mhadhbi, M., Naouach, A., Boumiza, A., Chaabani, M.F., BenAbderazzak, S., Darghouth, M.A., 2010. In vivo evidence for the resistance of *Theileria annulata* to buparvaquone. *Vet. Parasitol.* 169, 241-247.
- Mihalca, A.D., Cozma, V., Şuteu, E., Marinculic, A., Boireau, P., 2010. The quest for piroplasms: from Babes and Smith to molecules. *Sci.Parasitol* 11, 14-19.
- Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, 2003. Libro Blanco de la Agricultura y el Desarrollo Rural.
- Minjauw, B. and McLeod, A., 2003. Tick-borne diseases and poverty. The impact of ticks and tick- borne diseases on the livelihood of small-scale and marginal livestock owners in India and eastern and southern Africa. . Research report, DFID Animal Health Programme, Centre for Tropical Veterinary Medicine, University of Edinburgh, UK.
- Miranda Entrenas, S., 1945. La theileriosis bovina en España. *Zootecnia* , 62-68.
- Mohmad, A., Chandra, D., Saravanan, B.C., Manjunathchar, H.V., OR, V.K., Fular, A., Chigure, G., Kaur, N., Ghosh, S., 2018. Development of a recombinant TaSP-based Dot-ELISA for detection of *Theileria annulata* infection in cattle. *Ticks and Tick-borne Diseases* .
- Mohri, M., Sharifi, K., Eidi, S., 2007. Hematology and serum biochemistry of Holstein dairy calves: age related changes and comparison with blood composition in adults. *Res. Vet. Sci.* 83, 30-39.
- Molad, T., Erster, O., Fleiderovitz, L., Roth, A., Leibovitz, B., Wolkomirsky, R., Mazuz, M.L., Behar, A., Markovics, A., 2015. Molecular characterization of the Israeli *B. bigemina* vaccine strain and field isolates. *Vet. Parasitol.* 212, 147-155.
- Molad, T., Mazuz, M.L., Fleiderovitz, L., Fish, L., Savitsky, I., Krigel, Y., Leibovitz, B., Molloy, J., Jongejan, F., Shkap, V., 2006. Molecular and serological detection of *A. centrale*- and *A. marginale*-infected cattle grazing within an endemic area. *Vet. Microbiol.* 113, 55-62.

- Molloy, J.B., Bock, R.E., Templeton, J.M., Bruyeres, A.G., Bowles, P.M., Blight, G.W., Jorgensen, W.K., 2001. Identification of antigenic differences that discriminate between cattle vaccinated with *Anaplasma centrale* and cattle naturally infected with *Anaplasma marginale*. *Int. J. Parasitol.* 31, 179-186.
- Molloy, J.B., Bowles, P.M., Knowles, D.P., McElwain, T.F., Bock, R.E., Kingston, T.G., Blight, G.W., Dalglish, R.J., 1999. Comparison of a competitive inhibition ELISA and the card agglutination test for detection of antibodies to *Anaplasma marginale* and *Anaplasma centrale* in cattle. *Aust. Vet. J.* 77, 245-249.
- Molyneux, D.H., 1998. Vector-borne parasitic diseases—an overview of recent changes. *Int. J. Parasitol.* 28, 927-934.
- Moretti, P., Paltrinieri, S., Trevisi, E., Probo, M., Ferrari, A., Minuti, A., Giordano, A., 2017. Reference intervals for hematological and biochemical parameters, acute phase proteins and markers of oxidation in Holstein dairy cows around 3 and 30 days after calving. *Res. Vet. Sci.* 114, 322-331.
- Morrison, W.I., 2015. The aetiology, pathogenesis and control of theileriosis in domestic animals. *Rev. Sci. Tech.* 34, 599-611.
- Morrison, W.I., 2009. Progress towards understanding the immunobiology of *Theileria* parasites. *Parasitology* 136, 1415-1426.
- Morrison, W.I., McKeever, D.J., 2006. Current status of vaccine development against *Theileria* parasites. *Parasitology* 133 Suppl, 169.
- Mosqueda, J., Olvera-Ramirez, A., Aguilar-Tipacamu, G., Canto, G.J., 2012. Current advances in detection and treatment of babesiosis. *Curr. Med. Chem.* 19, 1504-1518.
- Mosqueda, J., Falcon, A., Alvarez, J.A., Ramos, J.A., Oropeza-Hernandez, L.F., Figueroa, J.V., 2004. *Babesia bigemina* sexual stages are induced in vitro and are specifically recognized by antibodies in the midgut of infected *Boophilus microplus* ticks. *Int. J. Parasitol.* 34, 1229-1236.
- Mukhebi, A.W., Perry, B.D., Kruska, R., 1992. Estimated economics of theileriosis control in Africa. *Prev. Vet. Med.* 12, 73-85.
- Munderloh, U.G., Blouin, E.F., Kocan, K.M., Ge, N.L., Edwards, W.L., Kurtti, T.J., 1996. Establishment of the tick (Acari: Ixodidae)-borne cattle pathogen *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in tick cell culture. *J. Med. Entomol.* 33, 656-664.
- Munderloh, U.G., Lynch, M.J., Herron, M.J., Palmer, A.T., Kurtti, T.J., Nelson, R.D., Goodman, J.L., 2004. Infection of endothelial cells with *Anaplasma marginale* and *A. phagocytophilum*. *Vet. Microbiol.* 101, 53-64.
- Naranjo, V., Ruiz-Fons, F., Hofle, U., Fernandez de Mera, I G, Villanua, D., Almazan, C., Torina, A., Caracappa, S., Kocan, K.M., Gortazar, C., De La Fuente, J., 2006. Molecular epidemiology of human and bovine anaplasmosis in southern Europe. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1078, 95-99.
- Nazifi, S., Razavi, S.M., Kaviani, F., Rakhshandehroo, E., 2012. Acute phase response in cattle infected with *Anaplasma marginale*. *Vet. Microbiol.* 155, 267-271.
- Nazifi, S., Razavi, S.M., Reiszadeh, M., Esmailnezhad, Z., Ansari-Lari, M., Hasanshahi, F., 2010. Evaluation of the resistance of indigenous Iranian cattle to *Theileria annulata* compared with Holstein cattle by measurement of acute phase proteins. *Comparative Clinical Pathology* 19, 155-161.
- Nene, V., Morrison, W.I., 2016. Approaches to vaccination against *Theileria parva* and *Theileria annulata*. *Parasite Immunol.* 38, 724-734.
- Nieder, M., Silaghi, C., Hamel, D., Pfister, K., Schmaschke, R., Pfeffer, M., 2012. Tick-borne fever caused by *Anaplasma phagocytophilum* in Germany: first laboratory confirmed case in a dairy cattle herd. *Tierarztl. Prax. Ausg. G. Grosstiere Nutztiere* 40, 101-106.
- Nilsson, O., Nordkvist, M., Ryden, L., 1965. Experimental *Babesia divergens* infection in reindeer (*Rangifer tarandus*). *Acta Vet. Scand.* 6, 353-359.
- Ogden, N.H., Bown, K., Horrocks, B.K., Woldehiwet, Z., Bennett, M., 1998. Granulocytic Ehrlichia infection in ixodid ticks and mammals in woodlands and uplands of the UK. *Med. Vet. Entomol.* 12, 423-429.



Ogden, N.H., Casey, A., French, N.P., Bown, K.J., Adams, J., Woldehiwet, Z., 2002. Natural Ehrlichia phagocytophila transmission coefficients from sheep 'carriers' to Ixodes ricinus ticks vary with the numbers of feeding ticks. Parasitology 124, 127-136.

OIE, 2018. Terrestrial animal health code , Capítulo 7.9.

OIE, 2012. Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres, Anaplasmosis bovina. Organización Mundial para la Sanidad Animal (OIE) 2.4.1.

Ojogun, N., Barnstein, B., Huang, B., Oskeritzian, C.A., Homeister, J.W., Miller, D., Ryan, J.J., Carlyon, J.A., 2011. Anaplasma phagocytophilum infects mast cells via  $\alpha$ 1, 3-fucosylated but not sialylated glycans and inhibits IgE-mediated cytokine production and histamine release. Infect. Immun. 79, 2717-2726.

Olmeda, A.S., Valcárcel, F., Camacho, A.T., Meana, A., 2002. Control de las piroplasmosis bovinas. Bovis 108, 57-64.

Olmeda, A.S., Sancho, F.V., García, A.T.C., Rodríguez, J.A., 2002. Ixódidos del ganado vacuno com vectores de enfermedades. Bovis 108, 11-18.

Ooshiro, M., Zakimi, S., Matsukawa, Y., Yafuso, M., Katagiri, Y., Inokuma, H., 2009. Anaplasma marginale infection in a Japanese Black cow 13 years after eradication of Rhipicephalus (Boophilus) microplus in Okinawa, Japan. Vet. Parasitol. 160, 351-355.

Oporto, B., Gil, H., Barral, M., Hurtado, A., Juste, R.A., GARCÍA-PÉREZ, A.L., 2003. A survey on Anaplasma phagocytophila in wild small mammals and roe deer (Capreolus capreolus) in Northern Spain. Ann. N. Y. Acad. Sci. 990, 98-102.

Oteo, J.A., Gil, H., Barral, M., Pérez, A., Jimenez, S., Blanco, J.R., De Artola, V.M., García-Pérez, A., Juste, R.A., 2001. Presence of granulocytic ehrlichia in ticks and serological evidence of human infection in La Rioja, Spain. Epidemiology & Infection 127, 353-358.

Oteo, J.A., Portillo, A., Santibáñez, S., PÉREZ-MARTÍNEZ, L., Blanco, J.R., Jiménez, S., Ibarra, V., PÉREZ-PALACIOS, A., Sanz, M., 2006. Prevalence of spotted fever group Rickettsia species detected in ticks in La Rioja, Spain. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1078, 320-323.

Oura, C., Tait, A., Asiimwe, B., Lubega, G.W., Weir, W., 2011. Haemoparasite prevalence and Theileria parva strain diversity in Cape buffalo (Syncerus caffer) in Uganda. Vet. Parasitol. 175, 212-219.

Øverås, J., Lund, A., Ulvund, M.J., Waldeland, H., 1993. Tick-borne fever as a possible predisposing factor in septicaemic pasteurellosis in lambs. Vet. Rec. 133, 398.

Pain, A., Renauld, H., Berriman, M., Murphy, L., Yeats, C.A., Weir, W., Kerhornou, A., Aslett, M., Bishop, R., Bouchier, C., 2005. Genome of the host-cell transforming parasite Theileria annulata compared with T. parva. Science 309, 131-133.

Pallas, E.P., 1999. Aproximacion al conocimiento de la epidemiologia de la babesiosis en Galicia. Universidad de Santiago de Compostela. Galicia.

Palmer, G.H., Abbott, J.R., French, D.M., McElwain, T.F., 1998. Persistence of Anaplasma ovis infection and conservation of the msp-2 and msp-3 multigene families within the genus Anaplasma. Infect. Immun. 66, 6035-6039.

Palmer, G.H., Barbet, A.F., Musoke, A.J., Katende, J.M., Rurangirwa, F., Shkap, V., Pipano, E., Davis, W.C., McGuire, T.C., 1988. Recognition of conserved surface protein epitopes on Anaplasma centrale and Anaplasma marginale isolates from Israel, Kenya and the United States. Int. J. Parasitol. 18, 33-38.

Palmer, G.H., Rurangirwa, F.R., Kocan, K.M., Brown, W.C., 1999. Molecular basis for vaccine development against the ehrlichial pathogen Anaplasma marginale. Parasitology Today 15, 281-286.

Palomar, A.M., Portillo, A., Santibanez, P., Mazuelas, D., Roncero, L., García-Alvarez, L., Santibanez, S., Gutierrez, Ó, Oteo, J.A., 2015. Detection of tick-borne Anaplasma bovis, Anaplasma phagocytophilum and Anaplasma centrale in Spain. Med. Vet. Entomol. 29, 349-353.

Palomar, A.M., Santibáñez, P., Mazuelas, D., Roncero, L., Santibáñez, S., Portillo, A., Oteo, J.A., 2012. Role of Birds in Dispersal of Etiologic Agents of Tick-borne Zoonoses, Spain, 2009. Emerging Infectious Diseases 18, 1188-1191.

- Papadopoulos, B., Perié, N.M., Uilenberg, G., 1996. Piroplasms of domestic animals in the Macedonia region of Greece 1. Serological cross-reactions. *Vet. Parasitol.* 63, 41-56.
- Parola, P., Raoult, D., 2001. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. *Clin. Infect. Dis.* 32, 897-928.
- Passos, L., Bell-Sakyi, L., Brown, C., 1998. Immunochemical characterization of in vitro culture-derived antigens of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. *Vet. Parasitol.* 76, 239-249.
- Penzhorn, B.L., Kjemtrup, A.M., Lopez-Rebollar, L.M., Conrad, P.A., 2001. *Babesia leo* n. sp. from lions in the Kruger National Park, South Africa, and its relation to other small piroplasms. *J. Parasitol.* 87, 681-685.
- Pereira, A., Parreira, R., Nunes, M., Casadinho, A., Vieira, M.L., Campino, L., Maia, C., 2016. Molecular detection of tick-borne bacteria and protozoa in cervids and wild boars from Portugal. *Parasit. Vectors* 9, 0.
- Petrovec, M., Lotric Furlan, S., Zupanc, T.A., Strle, F., Brouqui, P., Roux, V., Dumler, J.S., 1997. Human disease in Europe caused by a granulocytic *Ehrlichia* species. *J. Clin. Microbiol.* 35, 1556-1559.
- Pfäffle, M., Littwin, N., Muders, S.V., Petney, T.N., 2013. The ecology of tick-borne diseases. *Int. J. Parasitol.* 43, 1059-1077.
- Philip, C.B., 1974. Tribe, I. I. *Ehrlichieae*. , 893-897.
- Pipano, E., Mayer, E., Frank, M., 1985. Comparative response of Friesian milking cows and calves to *Anaplasma centrale* vaccine. *Br. Vet. J.* 141, 174-178.
- Pipano, E., Shkap, V., Kriegel, Y., Leibovitz, B., Savitsky, I., Fish, L., 2002. *Babesia bovis* and *B. bigemina*: persistence of infection in Friesian cows following vaccination with live antibabesial vaccines. *The Veterinary Journal* 164, 64-68.
- Popov, V.L., Han, V.C., Chen, S.-, Dumler, J.S., Feng, H.-, Andreadis, T.G., Tesh, R.B., Walker, D.H., 1998. Ultrastructural differentiation of the genogroups in the genus *Ehrlichia*. *J. Med. Microbiol.* 47, 235-251.
- Portillo, A., Pérez-Martínez, L., Santibanez, S., Santibanez, P., Palomar, A.M., Oteo, J.A., 2011. *Anaplasma* spp. in wild mammals and *Ixodes ricinus* from the north of Spain. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 11, 3-8.
- Potgieter, F.T., Stoltz, W.H., 2004. Bovine anaplasmosis, 594-616.
- Potgieter, F.T., van Rensburg, L., 1987a. The persistence of colostral *Anaplasma* antibodies and incidence of in utero transmission of *Anaplasma* infections in calves under laboratory conditions. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 54, 557-560.
- Potgieter, F.T., van Rensburg, L., 1987b. Tick transmission of *Anaplasma centrale*. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 54, 5-7.
- Precigout, E., Delbecq, S., Vallet, A., Carcy, B., Camillieri, S., Hadj-Kaddour, K., Kleuskens, J., Schetters, T., Gorenflot, A., 2004. Association between sequence polymorphism in an epitope of *Babesia divergens* Bd37 exoantigen and protection induced by passive transfer. *Int. J. Parasitol.* 34, 585-593.
- Precigout, E., Gorenflot, A., Valentin, A., Bissuel, G., Carcy, B., Brasseur, P., Moreau, Y., Schrevel, J., 1991. Analysis of immune responses of different hosts to *Babesia divergens* isolates from different geographic areas and capacity of culture-derived exoantigens to induce efficient cross-protection. *Infect. Immun.* 59, 2799-2805.
- Preston, P.M., Hall, F.R., Glass, E.J., Campbell, J.D., Darghouth, M.A., Ahmed, J.S., Shiels, B.R., Spooner, R.L., Jongejan, F., Brown, C.G., 1999. Innate and adaptive immune responses co-operate to protect cattle against *Theileria annulata*. *Parasitol. Today* 15, 268-274.
- Preston, P.M., Brown, C.G., Spooner, R.L., 1983. Cell-mediated cytotoxicity in *Theileria annulata* infection of cattle with evidence for BoLA restriction. *Clin. Exp. Immunol.* 53, 88.
- Preston, P.M., Darghouth, M., Boulter, N.R., Hall, R.F., Tall, R., Kirvar, E., Brown, D.C., 2002. A dual role for immunosuppressor mechanisms in infection with *Theileria annulata*: well-regulated suppressor macrophages help in recovery from infection; profound immunosuppression promotes non-healing disease. *Parasitol. Res.* 88, 522-534.
- Purnell, R.E., Young, E.R., Brocklesby, D.W., Hendry, D.J., 1977. The haematology of experimentally-induced *B. divergens* and *E. phagocytophila* infections in splenectomised calves. *Vet. Rec.* 100, 4-6.

- Pusterla, N., Braun, U., 1997. Clinical Findings in Cows after Experimental Infection with Ehrlichia phagocytophila. Transboundary and Emerging Diseases 44, 385-390.
- Pusterla, N., Braun, U., Wolfensberger, C., Lutz, H., 1997. Intrauterine infection with Ehrlichia phagocytophila in a cow. Vet. Rec. 141, 101-102.
- Pusterla, N., Huder, J., Wolfensberger, C., Braun, U., Lutz, H., 1997. Laboratory findings in cows after experimental infection with Ehrlichia phagocytophila. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 4, 643-647.
- Pusterla, N., Pusterla, J.B., Braun, U., Lutz, H., 1998. Serological, hematologic, and PCR studies of cattle in an area of Switzerland in which tick-borne fever (caused by Ehrlichia phagocytophila) is endemic. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 5, 325-327.
- Pusterla, N., Anderson, R.J., House, J.K., Berger Pusterla, J., DeRock, E., Madigan, J.E., 2001. Susceptibility of cattle to infection with Ehrlichia equi and the agent of human granulocytic ehrlichiosis. J. Am. Vet. Med. Assoc. 218, 1160-1162.
- PyGDroid, P.3., 2010. Altitude. 2.09a9.
- Rajput, Z.I., Hu, S., Arijio, A.G., Habib, M., Khalid, M., 2005. Comparative study of Anaplasma parasites in tick carrying buffaloes and cattle. Journal of Zhejiang University.Science.B 6, 1057.
- Rar, V., Golovljova, I., 2011. Anaplasma, Ehrlichia, and "Candidatus Neoehrlichia" bacteria: pathogenicity, biodiversity, and molecular genetic characteristics, a review. Infect. Genet. Evol. 11, 1842-1861.
- Razavi, S.M., Nazifi, S., Bateni, M., Rakhshandehroo, E., 2011. Alterations of erythrocyte antioxidant mechanisms: antioxidant enzymes, lipid peroxidation and serum trace elements associated with anemia in bovine tropical theileriosis. Vet. Parasitol. 180, 209-214.
- Reinbold, J.B., Coetzee, J.F., Hollis, L.C., Nickell, J.S., Riegel, C.M., Christopher, J.A., Ganta, R.R., 2010a. Comparison of iatrogenic transmission of Anaplasma marginale in Holstein steers via needle and needle-free injection techniques. Am. J. Vet. Res. 71, 1178-1188.
- Reinbold, J.B., Coetzee, J., Ganta, R., 2009. Comparison of three tetracycline antibiotic treatment regimens for carrier clearance of persistent Anaplasma marginale infection derived under field conditions. Proceedings of the 42nd Annual Conference of the American Association of Bovine Practitioners (AABP) .
- Reinbold, J.B., Coetzee, J.F., Hollis, L.C., Nickell, J.S., Riegel, C., Olson, K.C., Ganta, R.R., 2010b. The efficacy of three chlortetracycline regimens in the treatment of persistent Anaplasma marginale infection. Vet. Microbiol. 145, 69-75.
- Reppert, E., Galindo, R.C., Ayllon, N., Breshears, M.A., Kocan, K.M., Blouin, E.F., de la Fuente, J., 2014. Studies of Anaplasma phagocytophilum in sheep experimentally infected with the human NY-18 isolate: characterization of tick feeding sites. Ticks Tick Borne Dis. 5, 744-752.
- Richey, E.J., Palmer, G.H., 1990. Bovine anaplasmosis. Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian 12, 1661-1668.
- Rikihisa, Y., 2011. Mechanisms of obligatory intracellular infection with Anaplasma phagocytophilum. Clin. Microbiol. Rev. 24, 469-489.
- Rikihisa, Y., 1991. The tribe Ehrlichieae and ehrlichial diseases. Clin. Microbiol. Rev. 4, 286-308.
- Rikihisa, Y., Lin, M., Niu, H., 2010. Microreview: Type IV secretion in the obligatory intracellular bacterium Anaplasma phagocytophilum. Cell. Microbiol. 12, 1213-1221.
- Rikihisa, Y., Zhang, C., Christensen, B.M., 2003. Molecular Characterization of Aegyptianella pullorum (Rickettsiales, Anaplasmataceae). J. Clin. Microbiol. 41, 5294-5297.
- Ristic, M., 2018. Babesiosis of Domestic Animals and Man. , 9-10.
- Rjeibi, M.R., Ayadi, O., Rekik, M., Gharbi, M., 2018. Molecular survey and genetic characterization of Anaplasma centrale, A. marginale and A. bovis in cattle from Algeria. Transbound Emerg. Dis. 65, 456-464.
- Rodriguez, S.D., Palmer, G.H., McElwain, T.F., McGuire, T.C., Ruef, B.J., Chitko-McKown, M.G., Brown, W.C., 1996. CD4 T-helper lymphocyte responses against Babesia bigemina rhoptry-associated protein I. Infect. Immun. 64, 2079-2087.

- Rodriguez-Vivas, R.I., Jonsson, N.N., Bhushan, C., 2018. Strategies for the control of *Rhipicephalus microplus* ticks in a world of conventional acaricide and macrocyclic lactone resistance. *Parasitol. Res.* 117, 3-29.
- Romero-Salas, D., Mira, A., Mosqueda, J., García-Vázquez, Z., Hidalgo-Ruiz, M., Vela, N.A.O., de León, A. A. Pérez, Florin-Christensen, M., Schnittger, L., 2016. Molecular and serological detection of *Babesia bovis*- and *Babesia bigemina*-infection in bovines and water buffaloes raised jointly in an endemic field. *Vet. Parasitol.* 217, 101-107.
- Ros-García, A., García-Pérez, A.L., Verdera, J., Juste, R.A., Hurtado, A., 2012. Monitoring piroplasms infection in three cattle farms in Minorca (Balearic Islands, Spain) with previous history of clinical piroplamosis. *Vet. Parasitol.* 190, 318-325.
- Ros-García, A., Juste, R.A., Hurtado, A., 2012. A highly sensitive DNA bead-based suspension array for the detection and species identification of bovine piroplasms. *Int. J. Parasitol.* 42, 207-14.
- Ros-García, A., M'Ghirbi, Y., Bouattour, A., Hurtado, A., 2011. First detection of *Babesia occultans* in *Hyalomma* ticks from Tunisia. *Parasitology* 138, 578-582.
- Ros-García, A., Nicolas, A., García-Pérez, A.L., Juste, R.A., Hurtado, A., 2012. Development and evaluation of a real-time PCR assay for the quantitative detection of *Theileria annulata* in cattle. *Parasit. Vectors* 5, 171.
- Ruiz, J., Herrera, P.M., Barba, R., Busqué, J., 2017. Definición y caracterización de la extensividad en las explotaciones ganaderas en España. Situación de la ganadería extensiva en España (I) . Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, 1-98.
- Ruiz-Fons, F., Fernández-de-Mera, I.G., Acevedo, P., Gortázar, C., de la Fuente, J., 2012. Factors driving the abundance of *Ixodes ricinus* ticks and the prevalence of zoonotic *I. ricinus*-borne pathogens in natural foci. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 2669-2676.
- Ruiz-Fons, F., Fernández-de-Mera, I.G., Acevedo, P., Höfle, U., Vicente, J., de la Fuente, J., Gortázar, C., 2006. Ixodid ticks parasitizing Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) and European wild boar (*Sus scrofa*) from Spain: Geographical and temporal distribution. *Vet. Parasitol.* 140, 133-142.
- Russell, K.E., Roussel, A.J., 2007. Evaluation of the ruminant serum chemistry profile. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice* 23, 403-426.
- Rymaszewska, A., Grenda, S., 2008. Bacteria of the genus *Anaplasma*—characteristics of *Anaplasma* and their vectors: a review. *Vet. Med.* 53, 573-584.
- Salem, N., Yehia, S., Farag, H., Awny Elkhayat, M., 2016. Clinical, hemato-biochemical alterations and oxidant-antioxidant biomarkers in *Babesia*-infected calves. *International Journal of Veterinary Science and Medicine* 4, 17-22.
- Salih, D.A., El Hussein, A.M., Seitzer, U., Ahmed, J.S., 2007. Epidemiological studies on tick-borne diseases of cattle in Central Equatoria State, Southern Sudan. *Parasitol. Res.* 101, 1035-1044.
- Salih, D.E.A., Ahmed, J.S., Bakheit, M.A., Ali, E.B., Hussein, A.M.E., Hassan, S.M., Shariff, O.E., Fadl, M., Jongejan, F., 2005. Validation of the indirect TaSP enzyme-linked immunosorbent assay for diagnosis of *Theileria annulata* infection in cattle. *Parasitol. Res.* 97, 302-308.
- Samish, M., Ginsberg, H., Glazer, I., 2004. Biological control of ticks. *Parasitology* 129, S403.
- San Miguel, A., Roig, S., Alzuela, C., Cañeque, V., Ortuño, S., Cañellas, I., Malo, J., Martínez, T., Rodríguez, M., Monleón, J., 2009. Los pastos de la Comunidad de Madrid.
- Sandhu, G.S., Grewal, A.S., Singh, A., Kondal, J.K., Singh, J., Brar, R.S., 1998. Haematological and biochemical studies on experimental *Theileria annulata* infection in crossbred calves. *Vet. Res. Commun.* 22, 347-354.
- Sangwan, A.K., Chhabra, M.B., Samantaray, S., 1989. Relative role of male and female *Hyalomma anatolicum anatolicum* ticks in *Theileria* transmission. *Vet. Parasitol.* 31, 83-87.
- Santos, M., Soares, R., Costa, P., Amaro, A., Inácio, J., Gomes, J., 2013. Revisiting the Tams1-encoding gene as a species-specific target for the molecular detection of *Theileria annulata* in bovine blood samples. *Ticks and Tick-borne Diseases* 4, 72-77.
- Saravanan, B.C., Das, S., Siju, S.J., Tewari, A.K., Sankar, M., Kataktaaware, M.A., Ramesha, K.P., 2013. *Babesia bigemina* infection in yak (*Poephagus grunniens* L.): Molecular detection and characterization. *Vet. Parasitol.* 194, 58-64.

- Sato, M., Nishizawa, I., Fujihara, M., Nishimura, T., Matsubara, K., Harasawa, R., 2009. Phylogenetic Analysis of the 16S rRNA Gene of *Anaplasma* Species Detected from Japanese Serows (*Capricornis crispus*). Journal of Veterinary Medical Science 71, 1677-1679.
- Saud, N., Sheikh, I.U., Pourouchottamane, R., Bhattacharya, M., 2005. Haematology of babesiosis in yaks. Indian Veterinary Journal (India) .
- Scharf, W., Schauer, S., Freyburger, F., Petrovec, M., Schaarschmidt-Kiener, D., Liebisch, G., Runge, M., Ganter, M., Kehl, A., Dumler, J.S., García-Pérez, A.L., Jensen, J., Fingerle, V., Meli, M.L., Ensser, A., Stuen, S., von Loewenich, F.D., 2011. Distinct host species correlate with *Anaplasma phagocytophilum* ankA gene clusters. J. Clin. Microbiol. 49, 790-796.
- Schmid, N., Deplazes, P., Hoby, S., Ryser-Degiorgis, M., Edelhofer, R., Mathis, A., 2008. Babesia divergens-like organisms from free-ranging chamois (*Rupicapra r. rupicapra*) and roe deer (*Capreolus c. capreolus*) are distinct from *B. divergens* of cattle origin—an epidemiological and molecular genetic investigation. Vet. Parasitol. 154, 14-20.
- Schnittger, L., Rodriguez, A.E., Florin-Christensen, M., Morrison, D.A., 2012. Babesia: a world emerging. Infect. Genet. Evol. 12, 1788-1809.
- Secretaría General Técnica, Subdirección General de Estadística, 2014a. Encuesta Ganadera. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 1-2.
- Secretaría General Técnica, Subdirección General de Estadística, 2014b. Encuesta ganadera. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 1-2.
- Seitzer, U., Bakheit, M.A., Salih, D.E.A., Ali, A., Haller, D., Yin, H., Schnittger, L., Ahmed, J., 2007. From molecule to diagnostic tool: Theileria annulata surface protein TaSP. Parasitol. Res. 101, 217-223.
- Seré, C., Steinfeld, H., Groenewold, J., 1996. World livestock production systems.
- Sevilla, R.G., Corchero, E., Pena, J., Habela, M.A., 2002. Anaplasmosis bovina. Bovis 108, 77-84.
- Sharifiyazdi, H., Namazi, F., Oryan, A., Shahriari, R., Razavi, M., 2012. Point mutations in the Theileria annulata cytochrome b gene is associated with buparvaquone treatment failure. Vet. Parasitol. 187, 431-435.
- Sharma, A., Singla, L.D., Ashuma, Batth, B.K., Kaur, P., 2016. Clinicopatho-Biochemical Alterations Associated with Subclinical Babesiosis in Dairy Animals. J. Arthropod Borne Dis. 10, 258-266.
- Sharma, A., Singla, L.D., Tuli, A., Kaur, P., Batth, B.K., Javed, M., Juyal, P.D., 2013. Molecular prevalence of Babesia bigemina and Trypanosoma evansi in dairy animals from Punjab, India, by duplex PCR: a step forward to the detection and management of concurrent latent infections. BioMed research international 2013.
- Shiels, B.R., 1999. Should I stay or should I go now? A stochastic model of stage differentiation in Theileria annulata. Parasitology Today 15, 241-245.
- Shiels, B., Langsley, G., Weir, W., Pain, A., McKellar, S., Dobbelaere, D., 2006. Alteration of host cell phenotype by Theileria annulata and Theileria parva: mining for manipulators in the parasite genomes. Int. J. Parasitol. 36, 9-21.
- Shkap, V., Leibovitz, B., Krigel, Y., Molad, T., Fish, L., Mazuz, M., Fleiderovitz, L., Savitsky, I., 2008. Concomitant infection of cattle with the vaccine strain Anaplasma marginale ss centrale and field strains of A. marginale. Vet. Microbiol. 130, 277-284.
- Shkap, V., Molad, T., Fish, L., Palmer, G., 2002. Detection of the Anaplasma centrale vaccine strain and specific differentiation from Anaplasma marginale in vaccinated and infected cattle. Parasitol. Res. 88, 546-552.
- Shkap, V., Kocan, K., Molad, T., Mazuz, M., Leibovich, B., Krigel, Y., Michoytchenko, A., Blouin, E., De la Fuente, J., Samish, M., 2009. Experimental transmission of field Anaplasma marginale and the A. centrale vaccine strain by Hyalomma excavatum, Rhipicephalus sanguineus and Rhipicephalus (Boophilus) annulatus ticks. Vet. Microbiol. 134, 254-260.
- Shkap, V., Pipano, E., McGuire, T.C., Palmer, G.H., 1991. Identification of immunodominant polypeptides common between Anaplasma centrale and Anaplasma marginale. Vet. Immunol. Immunopathol. 29, 31-40.

- Silaghi, C., Nieder, M., Sauter-Louis, C., Knubben-Schweizer, G., Pfister, K., Pfeffer, M., 2018. Epidemiology, genetic variants and clinical course of natural infections with *Anaplasma phagocytophilum* in a dairy cattle herd. *Parasit. Vectors* 11, 1.
- Silaghi, C., Hamel, D., Thiel, C., Pfister, K., Passos, L.M.F., Rehbein, S., 2011. Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* in wild caprine and cervid ungulates from the Alps in Tyrol, Austria. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 11, 355-362.
- Silaghi, C., Liebisch, G., Pfister, K., 2011. Genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* from 14 equine granulocytic anaplasmosis cases. *Parasites & vectors* 4, 161.
- Silaghi, C., Pfister, K., Overzier, E., 2014. Molecular investigation for bacterial and protozoan tick-borne pathogens in wild boars (*Sus scrofa*) from southern Germany. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 14, 371-373.
- Silaghi, C., Skuballa, J., Thiel, C., Pfister, K., Petney, T., Pfäffle, M., Taraschewski, H., Passos, L.M., 2012. The European hedgehog (*Erinaceus europaeus*)-a suitable reservoir for variants of *Anaplasma phagocytophilum*? *Ticks and tick-borne diseases* 3, 49-54.
- Silva, M.G., Marques, P.X., Oliva, A., 2010. Detection of *Babesia* and *Theileria* species infection in cattle from Portugal using a reverse line blotting method. *Veterinary Parasitology* 174, 199-205.
- Simuunza, M., Weir, W., Courcier, E., Tait, A., Shiels, B., 2011. Epidemiological analysis of tick-borne diseases in Zambia. *Vet. Parasitol.* 175, 331-342.
- Singh, D.K., Thakur, M., Raghav, P.R., Varshney, B.C., 1993. Chemotherapeutic trials with four drugs in crossbred calves experimentally infected with *Theileria annulata*. *Res. Vet. Sci.* 54, 68-71.
- Sisson, D., Hufschmid, J., Jolles, A., Beechler, B., Jabbar, A., 2017. Molecular characterisation of *Anaplasma* species from african buffalo (*Syncerus caffer*) in kruger national park, South Africa. *Ticks and tick-borne diseases* 8, 400-406.
- SITRAN (Sistema integral de trazabilidad animal), 2014. Estudio del sector español de vacas nodrizas. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 1-27.
- Sivakumar, T., Hayashida, K., Sugimoto, C., Yokoyama, N., 2014. Evolution and genetic diversity of *Theileria*. *Infection, Genetics and Evolution* 27, 250-263.
- Sivakumar, T., Igarashi, I., Yokoyama, N., 2016. *Babesia ovata*: Taxonomy, phylogeny and epidemiology. *Vet. Parasitol.* 229, 99-106.
- Sivakumar, T., Lan, D.T.B., Long, P.T., Yoshinari, T., Tattiyapong, M., Guswanto, A., Okubo, K., Igarashi, I., Inoue, N., Xuan, X., 2013. PCR detection and genetic diversity of bovine hemoprotozoan parasites in Vietnam. *Journal of Veterinary Medical Science* 75, 1455-1462.
- Sivakumar, T., Tagawa, M., Yoshinari, T., Ybáñez, A.P., Igarashi, I., Ikehara, Y., Hata, H., Kondo, S., Matsumoto, K., Inokuma, H., 2012. PCR detection of *Babesia ovata* from cattle reared in Japan and clinical significance of co-infection with *Theileria orientalis*. *J. Clin. Microbiol.* 12.
- Skotarczak, B., Adamska, M., Sawczuk, M., Maciejewska, A., Wodecka, B., Rymaszewska, A., 2008. Coexistence of tick-borne pathogens in game animals and ticks in western Poland. *Vet. Med.* 53, 668-675.
- Skrabalo, Z., Deanovic, Z., 1957. Piroplasmosis in Man. Report on a Case. *Documenta de medicina geographica et tropica* 9, 11-16.
- Skuce, P.J., Mallon, T.R., Taylor, S.M., 1996. Molecular cloning of a putative rhoptry associated protein homologue from *Babesia divergens*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 77, 99-102.
- Smeenck, I., Kelly, P.J., Wray, K., Musuka, G., Trees, A.J., Jongejan, F., 2000. *Babesia bovis* and *B. bigemina* DNA detected in cattle and ticks from Zimbabwe by polymerase chain reaction. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 71, 21-24.
- Smith, T., Kilborne, F.L., 1893. Investigations into the nature, causation, and prevention of Texas or southern cattle fever. 1.
- Smith, T., 1889. Preliminary observations on the micro-organism of Texas fever. *Public health papers and reports* 15, 178.



Starcovici, C., 1893. Bemerkungen über den durch Babes entdeckten Blutparasiten und die durch denselben hervorgebrachten Krankheiten, die seuchenhafte Hämoglobinurie des Rindes (Babes), das Texasfieber (Th. Smith) und der Carceag der Schafe (Babes). Zbl.Bakt.I.Abt 14, 1-8.

Steinfeld, H., Wassenaar, T., Jutzi, S., 2006. Livestock production systems in developing countries: status, drivers, trends. Rev. - Off. Int. Epizoot. 25, 505-516.

Stojević, Z., Piršljini, J., Milinković-Tur, S., Zdelar-Tuk, M., Ljubić, B.B., 2005. Activities of AST, ALT and GGT in clinically healthy dairy cows during lactation and in the dry period. Veterinarski arhiv 75, 67-73.

Stuen, S., 2016. Tick-Borne Fever (Anaplasma phagocytophilum Infection) in Sheep - A Review. Journal of veterinary medicine and research 3, 1062.

Stuen, S., 2007. Anaplasma phagocytophilum - the most widespread tick-borne infection in animals in Europe. Vet. Res. Commun. 31 Suppl 1, 79-84.

Stuen, S., 1998. Sjødogg (tick-borne fever)-a historical review. Norsk Veterinærtidsskrift (Norway) 110, 703-706.

Stuen, S., Bergström, K., 2001. The effect of two different oxytetracycline treatments in experimental Ehrlichia phagocytophila infected lambs. Acta Vet. Scand. 42, 339-346.

Stuen, S., Handeland, K., Frammarsvik, T., Bergström, K., 2001. Experimental Ehrlichia phagocytophila infection in red deer (Cervus elaphus). Veterinary Record 149, 390-392.

Stuen, S., Nevland, S., Moum, T., 2003. Fatal Cases of Tick-Borne Fever (TBF) in Sheep Caused by Several 16S rRNA Gene Variants of Anaplasma phagocytophilum. Ann. N. Y. Acad. Sci. 990, 433-434.

Stuen, S., Bergström, K., Palmer, E., 2002. Reduced weight gain due to subclinical Anaplasma phagocytophilum (formerly Ehrlichia phagocytophila) infection. Exp. Appl. Acarol. 28, 209-215.

Stuen, S., Bergström, K., Petrovec, M., Van de Pol, I., Schouls, L.M., 2003. Differences in clinical manifestations and hematological and serological responses after experimental infection with genetic variants of Anaplasma phagocytophilum in sheep. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 10, 692-695.

Stuen, S., Granquist, E.G., Silaghi, C., 2013. Anaplasma phagocytophilum-a widespread multi-host pathogen with highly adaptive strategies. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology 3, 31.

Stuen, S., Scharf, W., Schauer, S., Freyburger, F., Bergström, K., Von Loewenich, F.D., 2010. Experimental infection in lambs with a red deer (Cervus elaphus) isolate of Anaplasma phagocytophilum. J. Wildl. Dis. 46, 803-809.

Suarez, C.E., Noh, S., 2011. Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. Vet. Parasitol. 180, 109-125.

Suarez, C.E., Palmer, G.H., Florin-Christensen, M., Hines, S.A., Hötzel, I., McElwain, T.F., 2003. Organization, transcription, and expression of rhoptry associated protein genes in the Babesia bigemina rap-1 locus. Mol. Biochem. Parasitol. 127, 101-112.

Suarez, C.E., Palmer, G.H., Hötzel, I., McElwain, T.F., 1998. Structure, sequence, and transcriptional analysis of the Babesia bovis rap-1 multigene locus1. Mol. Biochem. Parasitol. 93, 215-224.

Subdirección General de Estadística, 2017. Encuesta ganadera. Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente, 1-2.

Subdirección General de Productos Ganaderos, 2017. El sector de la carne de vacuno en cifras. Principales indicadores económicos (avance). Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente 1, 1-49.

Subdirección General de Productos Ganaderos, Dirección general de Producciones y Mercados Agrarios, 2018. Estudio del sector español de vacas nodrizas. Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente 1, 1-41.

Sugimoto, C., 1997. Economic importance of theileriosis in Japan. Trop. Anim. Health Prod. 29, 49S.

Sun, Y., Jouglin, M., Bastian, S., Chauvin, A., Malandrin, L., 2011. Molecular cloning and genetic polymorphism of Babesia capreoli gene Bcp37/41, an ortholog of Babesia divergens merozoite surface antigen Bd37. Vet. Parasitol. 178, 184-191.

- Tait, A., Hall, F.R., 1990. *Theileria annulata*: control measures, diagnosis and the potential use of subunit vaccines. *Rev. Sci. Tech.* 9, 387-403.
- Tate, C.M., Howerth, E.W., Mead, D.G., Dugan, V.G., Luttrell, M.P., Sahara, A.I., Munderloh, U.G., Davidson, W.R., Yabsley, M.J., 2013. *Anaplasma odocoilei* sp. nov. (family Anaplasmataceae) from white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*). *Ticks Tick Borne Dis.* 4, 110-119.
- Taylor, M.A., 2001. Recent developments in ectoparasiticides. *The Veterinary Journal* 161, 253-268.
- Taylor, S.M., Elliott, C.T., Kenny, J., 1986. Inhibition of *Babesia divergens* in cattle by oxytetracycline. *Vet. Rec.* 118, 98-102.
- Telford III, S.R., Goethert, H.K., 2004. Emerging tick-borne infections: rediscovered and better characterized, or truly 'new'? *Parasitology* 129 Suppl, 301.
- Terkawi, M.A., Huyen, N.X., Shinuo, C., Inpankaew, T., Maklon, K., Aboulaila, M., Ueno, A., Goo, Y., Yokoyama, N., Jittapalapong, S., 2011. Molecular and serological prevalence of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in water buffaloes in the northeast region of Thailand. *Vet. Parasitol.* 178, 201-207.
- Teshale, S., Geysen, D., Ameni, G., Asfaw, Y., Berkvens, D., 2015. Improved molecular detection of Ehrlichia and Anaplasma species applied to Amblyomma ticks collected from cattle and sheep in Ethiopia. *Ticks and tick-borne diseases* 6, 1-7.
- Theiler, A., 1903. The Rhodesian tick fever. *Transvaal Agricultural Journal* 1, 93-110.
- Theiler, A., 1911. Further investigations into anaplasmosis of South African cattle.. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 7-46.
- Theiler, A., 1910. *Anaplasma marginale* (gen.and spec.nov.): The marginal points in the blood of cattle suffering from a specific disease. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 7-59.
- Theiler, A., 1904. Rhodesian tick fever. *Transvaal Agricultural Journal* 2, 421-437.
- Thermo Fisher Scientific, 2009. NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer, V1.0 User Manual.
- Thomas, R.J., Birtles, R.J., Radford, A.D., Woldehiwet, Z., 2012. Recurrent bacteraemia in sheep infected persistently with *Anaplasma phagocytophilum*. *J. Comp. Pathol.* 147, 360-367.
- Thompson, C., Baravalle, M.E., Valentini, B., Mangold, A., de Echaide, S.T., Ruybal, P., Farber, M., Echaide, I., 2014. Typification of virulent and low virulence *Babesia bigemina* clones by 18S rRNA and rap-1c. *Exp. Parasitol.* 141, 98-105.
- Toledo, A., 2007. Dinámica de la infección de garrapatas por agentes zoológicos en la zona centro de la península Ibérica. *Universidad Complutense de Madrid. Madrid*, 179-191.
- Toledo, A., Olmeda, A.S., Escudero, R., Jado, I., Valcarcel, F., Casado-Nistal, M.A., Rodriguez-Vargas, M., Gil, H., Anda, P., 2009. Tick-borne zoonotic bacteria in ticks collected from central Spain. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 81, 67-74.
- Tomassone, L., Grego, E., Auricchio, D., Iori, A., Giannini, F., Rambozzi, L., 2013. Lyme borreliosis spirochetes and spotted fever group rickettsiae in ixodid ticks from Pianosa island, Tuscany Archipelago, Italy. *Vector-borne and Zoonotic Diseases* 13, 84-91.
- Torina, A., Caracappa, S., 2007. Anaplasmosis in cattle in Italy. *Vet. Res. Commun.* 31 Suppl 1, 73-78.
- Torina, A., Alongi, A., Naranjo, V., Estrada-Peña, A., Vicente, J., Scimeca, S., Marino, A.M., Salina, F., Caracappa, S., de la Fuente, J., 2008. Prevalence and genotypes of *Anaplasma* species and habitat suitability for ticks in a Mediterranean ecosystem. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 7578-7584.
- Troese, M.J., Carlyon, J.A., 2009. *Anaplasma phagocytophilum* dense-cored organisms mediate cellular adherence through recognition of human P-selectin glycoprotein ligand 1. *Infect. Immun.* 77, 4018-4027.
- Tuli, A., Singla, L.D., Sharma, A., Bal, M.S., Filia, G., Kaur, P., 2015. Molecular epidemiology, risk factors and hematochemical alterations induced by *Theileria annulata* in bovines of Punjab (India). *Acta Parasitol.* 60, 378-390.
- Tuomi, J., 1967. Experimental studies on bovine tick-borne fever. 1. Clinical and haematological data, some properties of the causative agent, and homologous immunity. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 70, 429-445.



Ueti, M.W., Knowles, D.P., Davitt, C.M., Scoles, G.A., Baszler, T.V., Palmer, G.H., 2009. Quantitative differences in salivary pathogen load during tick transmission underlie strain-specific variation in transmission efficiency of *Anaplasma marginale*. *Infect. Immun.* 77, 70-75.

Ueti, M.W., Reagan, J.O., Knowles, D.P., Scoles, G.A., Shkap, V., Palmer, G.H., 2007. Identification of Midgut and Salivary Glands as Specific and Distinct Barriers to Efficient Tick-Borne Transmission of *Anaplasma marginale*. *Infect. Immun.* 75, 2959-2964.

Uilenberg, G., 2006. Babesia--a historical overview. *Vet. Parasitol.* 138, 3-10.

Uilenberg, G., 1995. International collaborative research: significance of tick-borne hemoparasitic diseases to world animal health. *Vet. Parasitol.* 57, 19-41.

Urdaz-Rodriguez, J.H., Fosgate, G.T., Alleman, A.R., Rae, D.O., Donovan, G.A., Melendez, P., 2009. Seroprevalence estimation and management factors associated with high herd seropositivity for *Anaplasma marginale* in commercial dairy farms of Puerto Rico. *Trop. Anim. Health Prod.* 41, 1439-1448.

Valdez, R.A., McGuire, T.C., Brown, W.C., Davis, W.C., Jordan, J.M., Knowles, D.P., 2002. Selective in vivo depletion of CD4(+) T lymphocytes with anti-CD4 monoclonal antibody during acute infection of calves with *Anaplasma marginale*. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 9, 417-424.

Valentin, A., Precigout, E., L'Hostis, M., Carcy, B., Gorenflot, A., Schrevel, J., 1993. Cellular and humoral immune responses induced in cattle by vaccination with *Babesia divergens* culture-derived exoantigens correlate with protection. *Infect. Immun.* 61, 734-741.

Vannier, E., Krause, P.J., 2012. Human babesiosis. *N. Engl. J. Med.* 366, 2397-2407.

Vega, C.A., Buening, G.M., Green, T.J., Carson, C.A., 1985. In vitro cultivation of *Babesia bigemina*. *Am. J. Vet. Res.* 46, 416-420.

Venn, J., Woodford, M.H., 1956. An outbreak of tick-borne fever in bovines. *Vet. Rec.* 68, 132-133.

Vial, H.J., Gorenflot, A., 2006. Chemotherapy against babesiosis. *Veterinary Parasitology* 138, 147-160.

Vidotto, M.C., Kano, S.F., Gregori, F., Headley, S.A., Vidotto, O., 2006. Phylogenetic analysis of *Anaplasma marginale* strains from Paraná State, Brazil, using the msp1 $\alpha$  and msp4 genes. *Zoonoses and Public Health* 53, 404-411.

Viseras, J., Caballero, V., García-Fernández, P., 2000. Estudio epidemiológico de la Theileriosis Mediterránea en la provincia de Jaén.

Viseras, J., Fernandez, G., Adroher, F.J., 1996. Bovine theileriosis in Spain and its seroepidemiological diagnosis. *Ars Pharm.* 37, 451-461.

Viseras, J., García-Fernandez, P., 1999. Studies on theileriosis in Southern Spain. *Parassitologia* 41 Suppl 1, 111-115.

Viseras, J., Hueli, L.E., Adroher, F.J., García-Fernandez, P., 1999. Studies on the transmission of *Theileria annulata* to cattle by the tick *Hyalomma lusitanicum*. *Zentralbl. Veterinarmed. B.* 46, 505-509.

Viseras, J., García-Fernández, P., Adroher, F.J., 1997. Isolation and establishment in in vitro culture of a *Theileria annulata*-infected cell line from Spain. *Parasitol. Res.* 83, 394-396.

Visser, E.S., McGuire, T.C., Palmer, G.H., Davis, W.C., Shkap, V., Pipano, E., Knowles, D.P., Jr, 1992. The *Anaplasma marginale* msp5 gene encodes a 19-kilodalton protein conserved in all recognized *Anaplasma* species. *Infect. Immun.* 60, 5139-5144.

Waghela, S.D., Cruz, D., Droleskey, R.E., DeLoach, J.R., Wagner, G.G., 1997. In vitro cultivation of *Anaplasma marginale* in bovine erythrocytes co-cultured with endothelial cells. *Vet. Parasitol.* 73, 43-52.

Wang, T., Malawista, S.E., Pal, U., Grey, M., Meek, J., Akkoyunlu, M., Thomas, V., Fikrig, E., 2002. Superoxide anion production during *Anaplasma phagocytophila* infection. *J. Infect. Dis.* 186, 274-280.

Watts, J.G., Playford, M.C., Hickey, K.L., 2015. *Theileria orientalis*: a review. *N. Z. Vet. J.* 64, 3-9.

Webster, P., Ijdo, J.W., Chicoine, L.M., Fikrig, E., 1998. The agent of Human Granulocytic Ehrlichiosis resides in an endosomal compartment. *J. Clin. Invest.* 101, 1932-1941.

- Weir, W., Ben-Miled, L., Karagenç, T., Katzer, F., Darghouth, M., Shiels, B., Tait, A., 2007. Genetic exchange and sub-structuring in *Theileria annulata* populations. *Mol. Biochem. Parasitol.* 154, 170-180.
- Weir, W., Karagenç, T., Gharbi, M., Simuunza, M., Aypak, S., Aysul, N., Darghouth, M.A., Shiels, B., Tait, A., 2011. Population diversity and multiplicity of infection in *Theileria annulata*. *Int. J. Parasitol.* 41, 193-203.
- Whist, S.K., Storset, A.K., Johansen, G.M., Larsen, H., 2003. Modulation of leukocyte populations and immune responses in sheep experimentally infected with *Anaplasma* (formerly *Ehrlichia*) *phagocytophilum*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 94, 163-175.
- Whiting, T., 2005. Anaplasmosis, animal welfare, and bilateral trade between Canada and the USA. *Can. Vet. J.* 46, 935-941.
- Wilson, J.C., Foggie, A., Carmichael, M.A., 1964. Tick-borne fever as a cause of abortion and stillbirths in cattle. *Vet. Rec.* 76, 1081-1084.
- Woldehiwet, Z., 2010a. In-vitro studies on the susceptibility of ovine strains of *Anaplasma phagocytophilum* to antimicrobial agents and to immune serum. *J. Comp. Pathol.* 143, 94-100.
- Woldehiwet, Z., 2010b. The natural history of *Anaplasma phagocytophilum*. *Vet. Parasitol.* 167, 108-122.
- Woldehiwet, Z., 2008. Immune evasion and immunosuppression by *Anaplasma phagocytophilum*, the causative agent of tick-borne fever of ruminants and human granulocytic anaplasmosis. *Vet. J.* 175, 37-44.
- Woldehiwet, Z., 2006. *Anaplasma phagocytophilum* in Ruminants in Europe. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1078, 446-460.
- Woldehiwet, Z., 1991. Lymphocyte subpopulations in peripheral blood of sheep experimentally infected with tick-borne fever. *Res. Vet. Sci.* 51, 40-43.
- Woldehiwet, Z., Scott, G.R., 1982. Stages in the development of *Cytoecetes phagocytophila*, the causative agent of tick-borne fever. *J. Comp. Pathol.* 92, 469-474.
- World Bank, 2011. World Livestock Disease Atlas. A quantitative analysis of global animal health data (2006–2009), 11-12.
- Wright, I.G., 1990. Immunodiagnosis of and immunoprophylaxis against the haemoparasites *Babesia* sp. and *Anaplasma* sp. in domestic animals. *Rev.Sci.Tech.Off. Int.Epizoot* 9, 345-356.
- Yabsley, M.J., Davidson, W.R., Stallknecht, D.E., Varela, A.S., Swift, P.K., Devos Jr, J.C., Dubay, S.A., 2005. Evidence of tick-borne organisms in mule deer (*Odocoileus hemionus*) from the western United States. *Vector-Borne & Zoonotic Diseases* 5, 351-362.
- Yang, J., Han, R., Niu, Q., Liu, Z., Guan, G., Liu, G., Luo, J., Yin, H., 2018. Occurrence of four *Anaplasma* species with veterinary and public health significance in sheep, northwestern China. *Ticks and Tick-borne Diseases* 9, 82-85.
- Yang, J., Liu, Z., Niu, Q., Liu, J., Han, R., Guan, G., Hassan, M.A., Liu, G., Luo, J., Yin, H., 2017. A novel zoonotic *Anaplasma* species is prevalent in small ruminants: potential public health implications. *Parasites & Vectors* 10, 264.
- Ybañez, A.P., Matsumoto, K., Kishimoto, T., Inokuma, H., 2012. Molecular analyses of a potentially novel *Anaplasma* species closely related to *Anaplasma phagocytophilum* detected in sika deer (*Cervus nippon yessoensis*) in Japan. *Veterinary Microbiology* 157, 232-236.
- Yin, H., Lu, W., Luo, J., Zhang, Q., Lu, W., Dou, H., 1996. Experiments on the transmission of *Babesia major* and *Babesia bigemina* by *Haemaphysalis punctata*. *Veterinary Parasitology* 67, 89-98.
- Yoshimoto, K., Matsuyama, Y., Matsuda, H., Sakamoto, L., Matsumoto, K., Yokoyama, N., Inokuma, H., 2010. Detection of *Anaplasma bovis* and *Anaplasma phagocytophilum* DNA from *Haemaphysalis megaspinosus* in Hokkaido, Japan. *Veterinary Parasitology* 168, 170-172.
- Zahler, M., Rinder, H., Gothe, R., 2000. Genotypic status of *Babesia microti* within the piroplasms. *Parasitol. Res.* 86, 642-646.
- Zanet, S., Trisciuglio, A., Bottero, E., de Mera, I.G., Gortazar, C., Carpignano, M.G., Ferroglio, E., 2014. Piroplasmosis in wildlife: *Babesia* and *Theileria* affecting free-ranging ungulates and carnivores in the Italian Alps. *Parasit. Vectors* 7, 70.

- Zaugg, J.L., Goff, W.L., Foreyt, W., Hunter, D.L., 1996. Susceptibility of elk (*Cervus elaphus*) to experimental infection with *Anaplasma marginale* and *A. ovis*. *J. Wildl. Dis.* 32, 62-66.
- Zeidner, N.S., Burkot, T.R., Massung, R., Nicholson, W.L., Dolan, M.C., Rutherford, J.S., Biggerstaff, B.J., Maupin, G.O., 2000. Transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis by *Ixodes spinipalpis* ticks: evidence of an enzootic cycle of dual infection with *Borrelia burgdorferi* in Northern Colorado. *J. Infect. Dis.* 182, 616-619.
- Zhou, M., Cao, S., Sevinc, F., Sevinc, M., Ceylan, O., Moumouni, P.F.A., Jirapattharasate, C., Liu, M., Wang, G., Iguchi, A., Vudriko, P., Suzuki, H., Xuan, X., 2016. Molecular detection and genetic identification of *Babesia bigemina*, *Theileria annulata*, *Theileria orientalis* and *Anaplasma marginale* in Turkey. *Ticks Tick Borne Dis.* 7, 126-134.
- Ziapour, S.P., Kheiri, S., Fazeli-Dinan, M., Sahraei-Rostami, F., Mohammadpour, R.A., Aarabi, M., Asgarian, F., Sarafrazi, M., Nikookar, S.H., Enayati, A., 2016. Susceptibility status of field populations of *Rhipicephalus bursa* (Acari: Ixodidae) to pyrethroid insecticides. *Trop Biomed* 33, 446-461.
- Zintl, A., Gray, J.S., Skerrett, H.E., Mulcahy, G., 2005. Possible mechanisms underlying age-related resistance to bovine babesiosis. *Parasite Immunol.* 27, 115-120.
- Zintl, A., McGrath, G., O'Grady, L., Fanning, J., Downing, K., Roche, D., Casey, M., Gray, J.S., 2014. Changing incidence of bovine babesiosis in Ireland. *Ir. Vet. J.* 67, 19. eCollection 2014.
- Zintl, A., Mulcahy, G., Skerrett, H.E., Taylor, S.M., Gray, J.S., 2003. *Babesia divergens*, a bovine blood parasite of veterinary and zoonotic importance. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 622-636.
- Zobba, R., Anfossi, A.G., Pinna Parpaglia, M.L., Dore, G.M., Chessa, B., Spezzigu, A., Rocca, S., Visco, S., Pittau, M., Alberti, A., 2014. Molecular investigation and phylogeny of *Anaplasma* spp. in Mediterranean ruminants reveal the presence of neutrophil-tropic strains closely related to *A. platys*. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 271-280.